

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 9 日現在

機関番号：34419

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2015～2016

課題番号：15K18852

研究課題名(和文) 機能性アクリルアミドゲルを用いるマイクロチップ糖鎖分析システムの開発

研究課題名(英文) In situ photopolymerization of polyacrylamide gels for specific entrapment and analysis of carbohydrates using microchip electrophoresis

研究代表者

山本 佐知雄 (YAMAMOTO, Sachio)

近畿大学・薬学部・助教

研究者番号：10707954

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,200,000円

研究成果の概要(和文)：ピペットチップを用いる短時間酵素消化法では糖タンパク質から糖鎖を切断することができる酵素である、PNGase F固定化ピペットチップを再現性良く作製する方法を確立した。この方法は、既存の方法に比べ、酵素量、反応時間等を大幅に削減することが可能である。また、オンライン試料濃縮・標識法ではカルボキシルタイプのゲルをマイクロチップ流路交差部に作製し効率よくアミノ酸をオンラインで標識することができた。

多分岐流路を有するマイクロチップでの全分析操作のオンライン化では酵素消化、抽出・濃縮、標識、検出の操作に使用するための4つの独立した流路を有するマイクロチップを作製した。

研究成果の概要(英文)：For the fast releasing of N-linked glycans from glycoproteins, a simple and efficient method has been developed by fabricating trypsin and peptide-N4-(N-acetyl-glucosaminyl)asparagine amidase (PNGase F)-impregnated polyacrylamide gel onto a commercial pipette tip, respectively. The fixed enzymes maintained their activities on the polyacrylamide gel and the reaction was completed by a few times pipetting operation. Also, a simple and efficient method has been developed to fabricate sample concentrate and derivative on a channel of a commercial polymethylmethacrylate-made microchip. The availability of ionic acrylamide gel was demonstrated for the sensitive analysis of some FITC-amino acids under various buffer systems at several different pH. Then, the multi channel microchip was developed for combination of various functions of acrylamide gel, and achieves high-throughput glycans analysis.

研究分野：分析化学

キーワード：マイクロチップ電気泳動 糖鎖 オンライン濃縮 酵素消化

### 1. 研究開始当初の背景

マイクロチップ電気泳動は、一辺が数 cm の基盤上に幅 50~200  $\mu\text{m}$ 、深さ 5~150  $\mu\text{m}$  の様々な形状の流路を構築し、試料の導入と分離を一度に行えるようにしたものが主流である。分離系全体が微小化されており、一回の分析に要する試料量、泳動液量が nL から  $\mu\text{L}$  オーダーであり、分析時間も数秒から数分というハイスループットな分析法として利用されている。今後はバイオマーカー測定など高度な臨床試験への応用が求められているが、臨床検査などに応用するためには、マイクロチップ電気泳動の最大の欠点である高濃度の試料が必要となる問題を解決しなければならなかった。また、単に試料を分離するだけでなく前処理などの操作をチップの流路内で行えるような機能が必要となる。マイクロチップ電気泳動の多機能化に関する研究は世界中で盛んに行われているが、これらの多くは基盤となるマイクロチップを作製するために非常に高価な装置、あるいは卓越した技術が必要となっているため一般的に普及することは難しいと考えられる。

このような背景の中で申請者が開発した光重合性のアクリルアミドゲル層を作製する技術は、マイクロチップの流路の一部のみにゲル層を設けて機能を付加する方法であり、ナノスケールの制御を必要とする微細加工技術とほぼ同等の前処理を電圧印加のみで達成することができる。本研究ではこれら、光硬化性アクリルアミドゲルの用途拡大によるマイクロチップ電気泳動の糖鎖分析システムの開発を目的に実験を行った。

### 2. 研究の目的

本研究では、光硬化性アクリルアミドゲルの用途拡大とこれらを組み合わせることで新たな糖鎖分析システムを開発することを目的に実験を行う。具体的には、アクリルアミドゲル層を用いる短時間酵素消化法とマイクロチップの流路中で試料標識化反応、および濃縮・分離を一度に達成できる電気泳動法を開発し、欠点であった感度の問題を解決する。また、これら用途の異なるアクリルアミドゲル層を組み合わせることで、特定成分の抽出・濃縮・分離・検出など分析に必要な一連の操作を1枚のチップ上で行う新たな分析法の開発を行うことを目的とした。これが実現すれば血中抗体医薬品の詳細な体内動態の解明が可能なデバイスの開発に繋がるため、様々な社会的なニーズに合うと考えられる。

### 3. 研究の方法

平成 27 年度では市販のピペットチップを用いる短時間酵素消化法(オンチップ法)の開発と、短時間酵素消化法のオンラインマイクロチップ酵素消化法への適応に関する研究を遂行した。オンチップ法については酵素を混合した光硬化性アクリルアミドゲル溶

液を市販のピペットチップ内に作製してピペットチップで酵素消化を達成した。また、この酵素含有アクリルアミドゲルをマイクロチップの流路交差部に作製し、流路内での反応・分離条件の最適化を行った。

28 年度はカルボキシル基を有する光硬化性アクリルアミドゲルを用い、このゲル自体を試料濃縮と試料標識の反応場とするオンライン試料濃縮・標識化マイクロチップ電気泳動法の開発と現在までに開発した用途の異なるゲル層を多分岐流路を有するマイクロチップの流路上に配し、濃縮、反応、粗分画、特異的抽出の一連の過程を実現する方法の開発を行った。

### 4. 研究成果

ピペットチップを用いる短時間酵素消化法(オンチップ法)の開発では糖タンパク質から糖鎖を切断することのできる酵素である、PNGase F 固定化ピペットチップを再現性良く作製する方法を確立した。この方法は、既存の方法に比べ、酵素量、反応時間等を大幅に削減することが可能となっている。

オンラインマイクロチップ酵素消化法では、マイクロチップ流路内においてもアクリルアミドゲルによる酵素消化が達成できることを確認した。現状では酵素消化が完了した試料溶液を回収し、キャピラリー電気泳動装置で測定を行っているため、マイクロチップの出口にキャピラリーを接続できるシステムを作製している。

オンライン試料濃縮・標識法ではカルボキシルタイプのゲルをマイクロチップ流路交差部に作製し、5-(4, 6-dichlorotriazinyl)aminofluorescein を蛍光試薬、アスパラギン酸を試料モデルに検討を行った。条件の最適化を行ったところ、アスパラギン酸を導入した1分後に蛍光試薬の導入を開始することで効率よくオンライン標識化が進行した。現在、必須アミノ酸を一度に標識できる条件の最適化を実施している。

多分岐流路を有するマイクロチップでの全分析操作のオンライン化では酵素消化、抽出・濃縮、標識、検出の操作に使用するための4つの独立した流路を有するマイクロチップを作製した。これらの流路に対し、カルボン酸系のゲルを2つの異なる流路に作製し、アミノ酸混合試料からの酸性アミノ酸の特異的抽出とそれに続くオンライン標識化を試みた。その結果感度が若干低下したもののオンライン抽出した酸性アミノ酸のみを特異的に標識化し、検出することができた。

### 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

〔雑誌論文〕(計7件)

1. 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.,  
*J. Chromatogr. A* **1496**, 157–162, 2017
2. 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*, **38**, 23-30, 2017.
  3. Yamamoto S, Kinoshita M, Suzuki S: Current landscape of protein glycosylation analysis and recent progress toward a novel paradigm of glycoscience research *J. Pharm. Biomed. Anal.*, **130**, 273-300, 2016
  4. 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. *J. Chromatogr. A*, **1427**, 170-176, 2016
  5. Yamamoto S, Tamata Y, Sejima K, Kinoshita M, Suzuki S : Chiral separation of D/L-aldoses by micellar electrokinetic chromatography using a chiral derivatization reagent and a phenylboronic acid complex. *Anal. Bioanal. Chem.* **407(20)**, 6201-6206, 2015
  6. Yamamoto S, Iwata T, Nishiwaki K, Kinoshita M, Suzuki S : Synthesis of quaternary ammonium derivatives of cellulose as the coating reagents for capillary electrophoresis *Chromatography*, **36(3)**, 93-98, 2015
  7. Yamamoto S, Nagai E, Asada Y, Kinoshita M, Suzuki S: A rapid and highly sensitive microchip electrophoresis of mono- and mucin-type oligosaccharides labeled with 7-amino-4-methylcoumarin *Anal. Bioanal. Chem.*, **407**, 1499–1503, 2015.
- [学会発表](計 23 件)
1. 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  
日本薬学会第 137 年会 (東北大学, 宮城) 2017 年 3 月 24-27 日
  2. 山本佐知雄, 松井理恵、木下充弘、池上亨、西原啓二、鈴木茂生: DCpak PTZ カラムを用いた 8-aminopyrene-1,3,6-trisulfonic acid (APTS)標識化糖タンパク質由来糖鎖の HPLC 分析  
第 27 回クロマトグラフィー科学会議 (慶應義塾大学, 東京) 2016 年 11 月 16-18 日
  3. 山本佐知雄, 姫野美幸、小林正弥, 赤松美紀, 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化合物のオンライン濃縮マイクロチップ電気泳動法の開発  
第 36 回キャピラリー電気泳動シンポジウム (徳島大学, 徳島) 2016 年 11 月 9-11 日
  4. 山上真 松井友里恵、木下充弘、山本佐知雄、鈴木茂生 エキソグリコシダーゼ消化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解析  
第 36 回キャピラリー電気泳動シンポジウム(徳島大学, 徳島)2016 年 11 月 9-11 日
  5. 山本佐知雄、田又洋子、瀬島佳保里、木下充弘、鈴木茂生 フェニルポロン酸添加 MEKC による (S)-(+)-4-(N,N-Dimethylaminosulfonyl)-7-(3-aminopyrrolidin-1-yl)-2,1,3-benzoxadiazol 標識化 D-,L-糖の光学分離  
第 36 回キャピラリー電気泳動シンポジウム(徳島大学, 徳島)2016 年 11 月 9-11 日
  6. Sachio Yamamoto, Miyuki Himeno, Masaya Kobayashi, Miki Akamatsu, Mitsuhiro Kinoshita, Shigeo Suzuki: *In situ* photopolymerization of polyacrylamide gel for specific entrapment and analysis of a phosphorylated compounds using microchip electrophoresis  
The 12th International Conference on Protein Phosphatase (Kindai University, Osaka) 27-30 Oct 2016.
  7. 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  
第 65 回日本分析化学会年会 (北海道大学, 北海道) 2016 年 9 月 14-16 日
  8. 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  
第 29 回バイオメディカル分析科学シンポジウム (京都大学, 京都) 2016 年 9 月 2-3 日
  9. 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によるオンライン濃縮マイクロチップ電気泳動を用いるリン酸化ペプチドの簡易解析技術  
第 29 回バイオメディカル分析科学シン

- ポジウム(京都大学,京都)2016年9月2-3日
10. 山本佐知雄, 大西翔太, 鈴木翔, 木下充弘, 鈴木茂生: 光硬化性アクリルアミドゲルのピンポイント作製技術を用いる糖鎖の構造解析法の開発  
第76回分析化学討論会(岐阜薬科大学,岐阜)2016年5月27-28日(依頼講演)
  11. 鈴木茂生, 山上 眞, 松井友理恵, 木下充弘, 山本佐知雄: 糖鎖分析のための酵素消化部分導入キャピラリー電気泳動法の開発  
日本薬学会第136年会(パシフィコ横浜, 神奈川)2016年3月26-29日
  12. 木下充弘, 斉藤愛, 山本佐知雄, 早川堯夫, 鈴木 茂生: 糖鎖迅速解析のためのFmoc-ヒドラジン誘導体化と分離分析  
日本薬学会第136年会(パシフィコ横浜, 神奈川)2016年3月26-29日
  13. 山本佐知雄, 小林正弥, 丸井戸翔, 姫野美幸, 木下充弘, 鈴木茂生: 光重合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濃縮マイクロチップ電気泳動法の開発  
日本薬学会第136年会(パシフィコ横浜, 神奈川)2016年3月26-29日
  14. 竹田悠人, 林優花, 高本智世, 山本佐知雄, 木下充弘, 鈴木茂生: 化学修飾型シリカナノ粒子を用いるキャピラリー電気泳動法の開発  
日本薬学会第136年会(パシフィコ横浜, 神奈川)2016年3月26-29日
  15. 山本佐知雄, 小林正弥, 丸井戸翔, 姫野美幸, 木下充弘, 鈴木茂生: 光硬化性アクリルアミドゲルによるオンライン濃縮マイクロチップ電気泳動を用いるシグナル伝達経路におけるリン酸化ペプチドの発現量の解析  
Cheminas 32(北九州国際会議場, 福岡)2015年11月25-27日
  16. 山本佐知雄, 植田麻希, 加西優貴, 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  
第26回クロマトグラフィー科学会議(九州大学, 福岡)2015年11月11-13日
  17. 竹田悠人, 林優花, 高本智世, 山本佐知雄, 木下充弘, 鈴木茂生: 化学修飾型シリカナノ粒子を用いるキャピラリー電気泳動法の開発  
第35回キャピラリー電気泳動シンポジウム(岡山大学, 岡山)2015年11月4-6日
  18. 木下充弘, 藤井稔生, 竹田悠人, 山本佐知雄, 鈴木茂生: キャピラリー電気泳動を用いる糖ヌクレオチド及びその関連物質の分析  
第35回キャピラリー電気泳動シンポジウム(岡山大学, 岡山)2015年11月

- 4-6日
19. 竹田悠人, 林優花, 高本智世, 山本佐知雄, 木下充弘, 鈴木茂生: 化学修飾型シリカナノ粒子を用いるキャピラリー電気泳動法の開発  
第65回日本薬学会近畿支部総会・大会(大阪大谷大学, 大阪)2015年10月17日
  20. 鈴木茂生, 橋本真一, 岸本有加, 木下充弘, 山本佐知雄: オンライン抽出 HPLCを用いる糖タンパク質糖鎖蛍光標識体の簡便分析  
日本分析化学会第64年会(九州大学, 福岡)2015年9月9-11日
  21. 山本佐知雄, 松井理恵, 木下充弘, 池上亨, 西原啓二, 鈴木茂生: DCpak PTZ カラムを用いた8-aminopyrene-1,3,6-trisulfonic acid 標識化糖タンパク質由来糖鎖の HPLC 分析  
日本分析化学会第64年会(九州大学, 福岡)2015年9月9-11日
  22. 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  
第28回バイオメディカル分析科学シンポジウム(長崎大学, 長崎)2015年8月21-22日
  23. 山本佐知雄, 松井理恵, 木下充弘, 池上亨, 西原啓二, 鈴木茂生: DCpak PTZ カラムを用いた8-aminopyrene-1,3,6-trisulfonic acid 標識化糖タンパク質由来糖鎖の HPLC 分析  
第22回クロマトグラフィーシンポジウム(近畿大学, 大阪)2015年5月28-30日

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕

○出願状況(計0件)

○取得状況(計0件)

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.phar.kindai.ac.jp/analche2/>

6. 研究組織

(1)研究代表者

山本 佐知雄 (YAMAMOTO, Sachio)

近畿大学・薬学部・助教

研究者番号: 10707954