

令和 5 年 6 月 9 日現在

機関番号：17102

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2019～2022

課題番号：19H02567

研究課題名(和文) ナノスケール電気泳動法による一分子グライコム解析

研究課題名(英文) Single Molecule Glycomics by Nanoscale Electrophoresis

研究代表者

川井 隆之 (Kawai, Takayuki)

九州大学・理学研究院・准教授

研究者番号：60738962

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,200,000円

研究成果の概要(和文)：本研究ではマイクロ・ナノスケール電気泳動と蛍光一分子顕微鏡を組み合わせ、各構造の糖鎖を一分子ずつ見分けてその数を計測する「一分子グライコム解析法」を実現することを目標に研究を行った。糖鎖やタンパク質等の生体分子を対象に電気泳動分析を行ってその挙動をリアルタイムに動画として記録できる系を開発した。分子毎の電気泳動挙動をリアルタイムでモニタリングし、各分子のみかけの電気泳動速度を計測することで、分子の種類や状態を推定できることを確認した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究により、従来の化学分析法の感度限界が $z\text{mol}$  (1000分子レベル) から $y\text{mol}$  (1分子レベル) まで大幅に向上し、これまで不可能だった一細胞小器官・エクソソームなどからのグライコム解析を実現できると期待される。また本技術は糖鎖に限らず、タンパク質や核酸など蛍光標識可能なあらゆる物質に拡張可能であり、本研究が一分子計測が標準化する時代の幕開けを導く第一歩になると期待される。

研究成果の概要(英文)：In this research we aim to realize "single molecule glycome analysis" by coupling micro/nano-scale electrophoresis and single fluorescent molecule microscopy. Biomolecules including glycans and proteins were electrophoretically separated and migrating behavior of each molecule was observed as a movie. By analyzing their apparent electrophoretic velocity, molecular species and their condition like conjugation with another molecule were well determined.

研究分野：生命分析化学

キーワード：キャピラリー電気泳動 一分子顕微鏡 糖鎖 タンパク質

## 様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

糖鎖はガラクトース・マンノース等の単糖が重合して形成される高分子であり、タンパク質や脂質に結合して主に細胞膜上に発現しており、細胞認識・増殖・がん化などの多くの生命機能に関与している。網羅的に糖鎖を分析する「グライコム解析」により、がん幹細胞など一部の特殊な細胞にのみ特定の糖鎖が高発現していたり (*Stem Cells Dev.* **2012**, *21*, 2374), エクソソームなどの細胞外微粒子の輸送が糖鎖構造によって制御されている (*J Extracell. Vesicles.* **2018**, *7*, 1442985) ことが示唆されている。これらは性質の異なる細胞・微粒子を一部不純物とともに大量に集めた試料に対する分析結果であるため、誤差の大きな平均値しか得られておらず、細胞・微粒子一つずつが真にどのような糖鎖発現をしているのか解析する技術が求められている。

そこで申請者は糖鎖を 2000 倍程度濃縮できる濃縮法「large-volume dual preconcentration by isotachopheresis and stacking (LDIS)」を開発し、キャピラリー電気泳動 (CE)・レーザー励起蛍光 (LIF) 検出と組み合わせることで、100 細胞レベルの微量試料をグライコム解析できる、世界最高感度の分析法を開発した (*J. Chromatogr. A*, **2018**, *1565*, 138)。検出下限は約 400 zmol (約 25 万分子) と良好であるが、一細胞以下の解析を実現するためにはさらに大幅な感度向上が必要である。一方で分担研究者の谷口は独自の高分解能一分子顕微鏡を開発し、SDS-PAGE で分離したタンパク質を一分子感度で網羅解析することに成功している (*Bioconjugate Chem.* **2018**, *29*, 2541)。この一分子検出システムと、申請者の糖鎖濃縮・分離システムを効果的に融合することにより、一分子レベルのグライコム解析を実現できると着想した。

### 2. 研究の目的

一分子グライコム解析の実現のためには、単に 2 つの技術を組み合わせるだけでは達成できず、定量信頼性と分子同定性能を大きく向上する必要がある。例えば、一分子感度においては泳動液自体に蛍光夾雑成分が無視できない数で含まれており、試料から分離することもできないため、実際の対象分子数より多くカウントされていた。しかし、同一視野内に糖鎖と夾雑物が共存したとしても、分離挙動 (移動方向と速度) を観察すれば見分けることができる。さらにマイクロ・ナノスケールの空間を分離場に利用して分子拡散を抑制すれば、より正確に各分子の速度を測定できるため、一分子ずつ構造を正確に決定できると着想した。そこで本研究の目的を、マイクロ・ナノスケール電気泳動を用いた一分子グライコム解析システムの開発と設定した

### 3. 研究の方法

Cy5 によって標識したタンパク質もしくは 8-aminopyrene-1,3,6-trisulfonic acid (APTS) で標識した糖鎖を試料として、熔融石英キャピラリーまたはマイクロ・ナノチャンネルチップのインレットより試料を導入し、分子ふるいポリマーを添加した泳動液を用いてキャピラリーゲル電気泳動モードで分離を行った。検出部についてはフッ酸によって壁厚を 10-20  $\mu\text{m}$  程度まで減少させ、光の干渉効果を最小化した。電圧については直流モード、交流モードの二種類を利用して分子の泳動挙動をリアルタイムで計測できることを確認した。検出は既報の一分子顕微鏡をアレンジして用い、一分子電気泳動挙動を動画として取得した (*Bioconjugate Chem.* **2018**, *29*, 2541)。

#### 4. 研究成果

Cy5 標識タンパク質を対象に分析を行った結果、図 1a に示すように鮮明な一分子電気泳動動画を得ることに成功した。分子量の範囲としては、分子量 1000 以下のフリーの cy5 から 250 kDa のタンパク質までを幅広く検出し、その泳動挙動を動画として取得することができた。また得られた動画を専用ソフトにて情報処理することで、各分子の電気泳動の軌跡を取得したり、これらの蛍光強度を時間に対してプロットしたエレクトロフェログラムの取得に成功した (図 1 bc)。

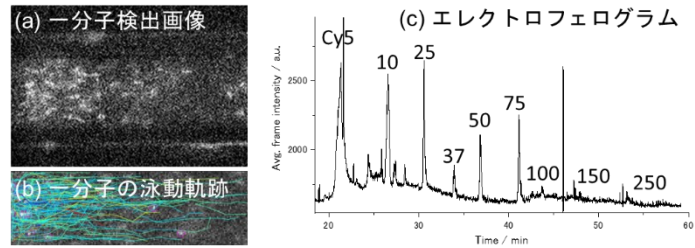


図 1. Cy5 標識タンパク質の一分子電気泳動分析結果. (a) 一分子電気泳動動画のキャプチャー, (b) 一分子電気泳動動画を解析して得た各分子の泳動軌跡. (c) 全蛍光分子の強度を時間に対してプロットしたエレクトロフェログラム.

続いて、各種分子についてどの速度を持つ分子が何個検出されたかを解析した結果を図 2 に示す。この結果、各分子が分子量に依存して異なる電気泳動速度を有していることが分かり (分子量が大きい程度速度が小さい)、分子ふるい効果に基づく生体分子の電気泳動分離効果を一分子レベルでも確認することに成功した。これらの研究開発成果について現在さらなる解析・考察を進めており、近日中に論文投稿を予定している。

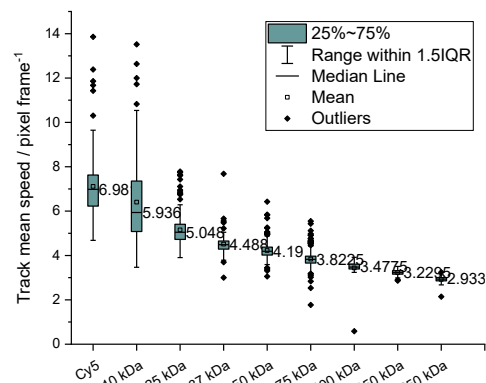


図 2. Cy5 標識タンパク質の一分子電気泳動分析動画より解析した各分子の見かけの電気泳動速度。

一方で各分子の泳動速度は非常に大きなばらつきを持つことが分かり、分子量が小さいほど顕著であることが分かった。これは溶液中の分子拡散を反映していると考えられる。分子量が大きな分子については一分子毎の電気泳動挙動を正確に捉えることができるが、分子量が小さな分子については高粘度の泳動液を利用して分子拡散を抑制するか、分子拡散を大きく上回る電気泳動速度を与えるなどの改善が必要であると考えられる。実際に APTS 標識糖鎖の分析で一般的に利用される低粘性の泳動液を利用して一分子糖鎖観察を行った結果、分子拡散が大きいため明確な輝点として一分子の泳動挙動を捉えることが難しかった。一方でタンパク質分析に利用する高粘性の泳動液を利用すると一分子の動きを観察することができたことから、粘性の高い溶液の利用が必須であることが判明した。現在高精度の一分子分析に向け、さらなる泳動条件の改善を進めている。また高出力のレーザーを利用して試料の励起を行っていることから、分子の追跡中に消光してしまうリスクがある。Cy5 より APTSの方が消光がより顕著であり、現在他の色素の検討や高電圧を用いた分析の高速化などを通じ、より頑健な分析条件の検討を進めている。

以上のように、本研究により一分子電気泳動分析の基盤を構築することに成功し、現在さらに技術改良を進めて実用化に向けて開発を継続している。これにより、これまで不可能だった一細胞小器官・エクソソームなどからのグライコム解析を実現できると期待される。また本技術は糖鎖に限らず、タンパク質や核酸など蛍光標識可能なあらゆる物質に拡張可能であり、本研究が一分子計測が標準化する時代の幕開けを導く第一歩になると期待される。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計6件（うち査読付論文 2件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Kawai Takayuki, Mihara Yasuhiro, Morita Makiko, Ohkubo Masahiko, Asami Taiji, Watanabe Tomonobu M.	4. 巻 93
2. 論文標題 Quantitation of Cell Membrane Permeability of Cyclic Peptides by Single-Cell Cytoplasm Mass Spectrometry	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Analytical Chemistry	6. 最初と最後の頁 3370 ~ 3377
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1021/acs.analchem.0c03901	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 KAWAI Takayuki	4. 巻 37
2. 論文標題 Recent Advances in Trace Bioanalysis by Capillary Electrophoresis	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Analytical Sciences	6. 最初と最後の頁 27 ~ 36
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.2116/analsci.20sar12	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Shinkai Soya, Nakagawa Masaki, Sugawara Takeshi, Togashi Yuichi, Ochiai Hiroshi, Nakato Ryuichiro, Taniguchi Yuichi, Onami Shuichi	4. 巻 2
2. 論文標題 PHi-C: deciphering Hi-C data into polymer dynamics	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 NAR Genomics and Bioinformatics	6. 最初と最後の頁 lqaa020
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1093/nargab/lqaa020	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Kumar Vipin, Leclerc Simon, Taniguchi Yuichi	4. 巻 48
2. 論文標題 BHi-Cect: a top-down algorithm for identifying the multi-scale hierarchical structure of chromosomes	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Nucleic Acids Research	6. 最初と最後の頁 e26 ~ e26
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1093/nar/gkaa004	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Kawai Takayuki, Ota Nobutoshi, Okada Kaori, Imasato Akiko, Owa Yuri, Morita Makiko, Tada Misa, Tanaka Yo	4. 巻 91
2. 論文標題 Ultrasensitive Single Cell Metabolomics by Capillary Electrophoresis-Mass Spectrometry with a Thin-Walled Tapered Emitter and Large-Volume Dual Sample Preconcentration	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Analytical Chemistry	6. 最初と最後の頁 10564 ~ 10572
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1021/acs.analchem.9b01578	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Leclerc Simon, Arntz Youri, Taniguchi Yuichi	4. 巻 146
2. 論文標題 Proteome-wide Quantification of Labeling Homogeneity at the Single Molecule Level	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Journal of Visualized Experiments	6. 最初と最後の頁 e59199
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3791/59199	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計5件 (うち招待講演 5件 / うち国際学会 0件)

1. 発表者名 川井 隆之
2. 発表標題 超高感度キャピラリー電気泳動 - 質量分析法の開発と一細胞メタボローム分析への応用
3. 学会等名 日本分析化学会 第80回分析化学討論会 (招待講演)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 川井 隆之
2. 発表標題 超高感度キャピラリー電気泳動法の開発と組織微小環境のオミックス分析
3. 学会等名 日本分析化学会 第69年会 (招待講演)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 川井 隆之
2. 発表標題 極微量・定量的メタボローム分析技術の開発と応用
3. 学会等名 日本質量分析学会 イオン反応研究部会 2020年前期研究会（招待講演）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Takayuki Kawai
2. 発表標題 Development of Ultra-sensitive Capillary Electrophoresis and Application to in vitro/vivo Trace Bioanalysis
3. 学会等名 Pittcon 2021（招待講演）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 川井隆之
2. 発表標題 超高感度キャピラリー電気泳動を用いた微量オミックス分析
3. 学会等名 日本プロテオーム学会2019年大会・第70回日本電気泳動学会総会 合同大会（招待講演）
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	谷口 雄一  (Taniguchi Yuichi)  (90556276)	京都大学・高等研究院・教授    (14301)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8 . 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------