

令和 6 年 6 月 14 日現在

機関番号：34419

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2021～2023

課題番号：21K06505

研究課題名（和文）時間軸上で変化する代謝と糖鎖の関係解明に向けた高スループット糖鎖解析システム開発

研究課題名（英文）Development of high-throughput glycan analysis system for understanding relationship between cellular metabolism and glycan biosynthesis

研究代表者

木下 充弘（Kinoshita, Mitsuhiro）

近畿大学・薬学部・教授

研究者番号：40330279

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 1,900,000円

研究成果の概要（和文）：全自動マイクロチップ電気泳動装置を用いて高スループットな糖鎖解析システムを開発し、開発したシステムを細胞を用いる代謝モデルにおける代謝変動と糖鎖構造のかかわりを解明するため応用した。開発したシステムは従来の糖鎖解析に比べ10倍以上スループット向上を達成できた。また、細胞増殖因子などによる代謝変化の解析へと応用し、糖鎖が遺伝子発現を伴わない代謝変化の影響を受け変化しうることを明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究は、マイクロチップ電気泳動装置を糖鎖解析技術として利用しつつ、糖鎖と代謝の関係に踏み込み、加齢や老化に伴う代謝の変動こそ糖鎖構造に影響を与えうる要因であることを明らかにし、同時に糖鎖研究におけるマイクロチップ電気泳動法の有用性を実証する試金石となる研究として、社会的意義は大きいと言える。

研究成果の概要（英文）：We developed a high-throughput glycan analysis system using a fully automatic microchip electrophoresis device, and applied the developed system to elucidate the relationship between metabolic fluctuations and glycan structure in a metabolic model using cells. The developed system was able to achieve a throughput improvement of more than 10 times compared to conventional glycan analysis. Furthermore, we applied this method to the analysis of metabolic changes caused by cell growth factors, etc., and revealed that sugar chains can change under the influence of metabolic changes that do not involve gene expression.

研究分野：分析化学

キーワード：マイクロチップ電気泳動 高スループット 糖タンパク質糖鎖 代謝

## 1. 研究開始当初の背景

本研究課題の最終目標は、時間軸上で常に変動する代謝と、その影響を受けて変化する糖鎖構造の関係について科学的証拠を得ることであり、定量的分析化学的アプローチによる糖鎖分析に基づいて加齢や老化のプロセスを追跡できることを実証することを研究の軸とした。この目的達成に不可欠な技術要素は、膨大な糖鎖プロファイルデータを短期間に蓄積できる解析技術であり、最終目標達成のためには、試料調製と分離分析技術の両方についてのスループットの向上が必要であった。研究開始当初、糖鎖の定量的解析手法の主なものは高速液体クロマトグラフィーであり、スループット性の向上を目指すことは困難であったが、研究代表者である木下は、パラレル分析が可能なマイクロチップ電気泳動装置を用い、96 試料を約 3 時間で分析可能な分析法の基礎検討を既に終えており、糖鎖の高スループット解析に馴染む多検体処理が可能な試料調製法、電気泳動パターンから糖鎖ピークのアノテーションの自動化を達成できる仕組みを構築できれば、目標の実現の可能性が高まるとともに、糖鎖とこれらの技術基盤を踏まえてモデル細胞を利用し、糖鎖構造と代謝の関係に踏み込むことに挑戦可能な状況下で本課題を開始した。

## 2. 研究の目的

糖鎖の多角的な構造多様変化を生む要因として、糖鎖が細胞内の代謝環境に最も近い位置で生合成されることが挙げられる。それ故に、糖鎖は遺伝子の発現パターンに依らない代謝依存的な変化を生じ、リアルタイムな細胞の表現型としても相応しい存在である。また、糖鎖は 2 万余という限られた数のタンパク質に無限に近い多様性を与え、タンパク質機能を調節している。糖鎖の違いがタンパク質機能に影響する場合、糖鎖の変化が遺伝子発現情報からは説明できないことが多く、遺伝子以外の“糖鎖構造を変化させる要因”について深く考える必要がある。具体的には、時間軸上で変動し続ける代謝と糖鎖の構造多様性の関係を明らかにする必要があるが、これには“遺伝子非依存的な糖鎖生合成の調節”を理解しなければならない。

遺伝子の直接の産物ではない糖鎖を対象として、時間軸上で変動し続ける代謝との相関を明らかにするためには、糖鎖と代謝の情報をリンクさせつつ大規模にそれらを蓄積すれば、糖鎖プロファイルの変動から、生活習慣や加齢などのさまざまな生理的状态を把握し、未病から発病に至るプロセスの理解が新しい領域に踏み込むことが可能となる。この仮定に基づき、糖鎖と代謝の親密な関係を実証するために、何よりも必要なものは膨大なデータ蓄積を可能にする高スループット解析手法である。しかしながら、糖鎖解析手法自体がゲノミクスやプロテオミクスからの恩恵を受けにくいクロマトグラフィーを軸とする分離分析法、質量分析やレクチンアレイに代表される高感度化と高精度化に力点が置かれ、スループットの向上は成しえていない。DNA シーケシングが、スラブゲル電気泳動からキャピラリー電気泳動へシフトし、スループットが劇的に向上したように、定量解析が不可欠な糖鎖研究において、その並列解析の実現のために電気泳動法は最有力候補であるが、高スループットな解析手法としての報告例は少ない。本研究では、研究課題を達成するために“糖鎖の高スループットな解析手法”の実現を最優先課題とし、DNA 自動分析に対応するマイクロチップ電気泳動装置を用いる糖タンパク質糖鎖分析法の開発し、分析法としての頑健性、装置として堅牢性を研究期間前半において実証した。糖鎖解析高スループット化では、分析試料調製の簡便化とスループット性の向上も不可欠であり、これらの開発も合わせて実施した。

一方、糖鎖と代謝の親密な関係を実証するためのテーマとして、加齢や老化は最も適した材料の 1 つである。細胞の分化やがん化のような特別なプロセス、例えば、糖転移酵素の発現変化などに依らず、加齢や老化などによる代謝変化を伴う生物学的プロセス上での時間軸上の糖鎖の変動を解析することは、遺伝子情報からは識別できない細胞・組織・個体レベルでの Phenotype の違いの把握に繋がり、Genotype と Glycotype を組合せて Phenotype を理解すれば、これまでの生命現象における常識が覆される可能性も秘めている。これらの点を踏まえ、糖鎖と代謝の関係解明に適した細胞モデルとして、ヒト肝細胞癌細胞 HepG2 を用いて検討した。HepG2 は、MAPK 経路や PI3K 経路による代謝変化が明らかにされていることに加え、グルコースやアミノ酸の利用率が高くかつ糖タンパク質生成量の高い細胞として、本研究課題の実証実験に適した細胞として利用し、各種細胞増殖因子による MAPK 経路および PI3K 経路活性化が、Glycotype の変動に与える影響について検討した。

## 3. 研究の方法

当該装置を利用して高スループット糖鎖解析を実施する上での課題は、i) 多検体処理に対応できる糖鎖試料調製法の開発、ii) 検出ピークのアノテーション法の開発であり、令和 3 年度はこの 2 項目に注力し研究を実施した。i) 試料の脱塩性能に優れかつ精製と濃縮を同時に達成で

きる糖鎖試料調製法については、特別な固相抽出法を利用せず、簡単な溶媒抽出により精製できる方法、ii) グルコースホモポリマー (Glc 1-6Glc) を糖鎖サイズマーカーとして用い、各ピークの Glucose unit (GU) と、特異性の異なるレクチンアフィニティ電気泳動法の原理を組み合わせ、アノテーションを行う手法の開発を検討した。令和4年度は、初年度に開発したマイクロチップ電気泳動装置を用いる解析法について、実証実験を行い分析再現性、頑健性、堅牢性を評価するとともに、種々の方法により HepG2 からアスパラギン結合型 (N-結合型糖鎖) を調製し、開発した分析手法に適用した。HepG2 からの N-結合型糖鎖の調製については、マイクロチップを分析の場とすることからも、分析性能に影響しない除タンパク質および除脂質法に、塩析、二層分配、逆相系固相抽出を含めて糖鎖精製法の最適化を検討した。最終年度は、グルコース、グルタミンなどの細胞外環境を変化させた HepG2 細胞モデルの糖鎖解析を行うとともに、グルコース、アミノ酸、アセチル CoA の細胞内代謝を変化させるホルモン類、増殖因子類、サイトカイン類について、細胞糖鎖構造への影響について解析した。細胞内代謝を変化させるモデルとしては、上皮細胞増殖因子 (EGF)、線維芽細胞増殖因子 (FGF)、インスリンを用いて検討した。

#### 4. 研究成果

初年度においては、研究期間開始前より着手していた全自動マイクロチップ電気泳動装置を用いる、糖タンパク質糖鎖分析法の各種条件について詳細に検討し、リニアポリアクリルアミドケルを含む緩衝液系にて、8-アミノピレン-1, 3, 6-トリルスフォネート標識された糖鎖を、高い分離能を発揮しつつ 100 秒以内に分離可能な条件を開発することに成功した。また、確立した方法を、別途開発した迅速簡便な糖鎖試料調製法と組み合わせ用いる一連の糖鎖解析ワークフローの実行可能性について検証した。その結果、標準糖タンパク質試料およびヒト血清糖タンパク質からの糖鎖試料の調製から糖鎖プロファイリングまでを同一日中に完了できることを実証できた。

2022 年度は研究期間初年度に全自動マイクロチップ電気泳動装置を利用して開発した糖鎖解析システムについて、実用性の検証として分離場として使用する電極埋め込み型石英製マイクロチップ、APTS 標識糖鎖の分離に用いるゲルバッファーについての劣化試験を 10 か月に渡り実施した。石英製マイクロチップについては、特別な洗浄剤や洗浄工程なく水のみでの洗浄でも分離能、電気泳動時間の再現性が保たれていた。また、分離に用いるゲルバッファーについても冷蔵保存のみでも、分析再現性は保持されており、本研究の目的である代謝と糖鎖の関係を明らかにするために必要となる大量試料かつ長期間での実用レベルにあることを実証できた。これらの性能評価試験に加え、ヒト血清糖タンパク質糖鎖、培養細胞から得られた膜タンパク質由来糖鎖の分析への応用試験も実施しつつ、レクチンを用いた糖鎖ピークの自動アノテーション法についても検討した結果、レクチンとして ConA、DSA、WFA、AAL、SSA を組合せて用いることで、糖鎖のコア構造を明瞭に識別でき、これらと糖鎖サイズ情報 (GU 値) を組み合わせることで、ヒトで発現する主要な N-結合型糖鎖の簡易に同定できることが可能となった。

2023 年度は、HepG2 細胞を EGF/FGF など増殖因子など、細胞内代謝を変化させる薬剤存在下培養し、膜タンパク質から調製した糖鎖の分析へと応用し、本研究の最終目的である代謝と糖鎖の関係解明に向け、多検体試料について解析とデータを蓄積した。その過程において、新たに糖鎖非還元末端のシアル結合様式の違いを区別するための、シアル結合様式特異的アミド化反応 (SALSA 法) を糖鎖試料調製のワークフローの一つとして適用し、その有用性を明らかにするとともに、HepG2 細胞のセクレトーム中糖タンパク質糖鎖解析へと応用した。シアル結合様式特異的アミド化反応 (SALSA 法) については、複合型 2, 3, 4 本鎖 N 型糖鎖の 2-3/ 2-6 シアル酸結合様式の違いを、アミド化に用いるアルキルアミンの種類を使い分けることで識別可能となった。本技術により、従来電気泳動分離では識別が困難であったシアル酸結合様式の違いを、10 試料/1 時間のスループットで解析できる方法を開発した。細胞の代謝とタンパク質糖鎖の関係解析については、GlcN 含有培養液中培養した HepG2 を増殖因子 (EGF/FGF) 刺激し分泌されるセクレトーム中の N 結合型糖鎖を解析した結果、FGF 刺激時間依存的に、複合型 3, 4 本鎖 N 型糖鎖を持つ糖タンパク質の分泌量が増加することを明らかにした。また、FGF 刺激時間依存的な糖鎖の変化は MAPK 経路、PI3K 経路のキナーゼ阻害剤によりキャンセルされることを経時的な変化として捉えることができた。従来まで、これらの情報を取得するためには、HPLC-MS により大掛かりな糖鎖解析が必要であったが、全自動マイクロチップ電気泳動装置を利用する解析法を開発したことで、糖鎖と代謝の関係に迫る研究基盤を形成するとともに、MAPK 経路、PI3K 経路のような、がんをはじめとする種々の疾患において活性化され、細胞内代謝が変化する環境下での糖鎖の変動を、開発したマイクロチップ電気泳動を基盤とする解析技術により明らかにすることができた。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 4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 Yamamoto S, Yano S, Kinoshita M, Suzuki S	4. 巻 7
2. 論文標題 In situ pin-point photopolymerization of Phos-tag polyacrylamide gel in poly(dimethylsiloxane)/glass microchip for specific entrapment, derivatization, and separation of phosphorylated compounds	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Gels	6. 最初と最後の頁 268
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3390/gels7040268	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 Yamamoto S, Miyawaki N, Kawakami N, Kinoshita M, Suzuki S	4. 巻 71
2. 論文標題 Study of HPLC separation and fractionation of 8-aminopyrene-1,3,6-trisulfonic acid labeled N-glycans using a hydrophilic interaction chromatography column	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 BUNSEIKAGAKU	6. 最初と最後の頁 333-339
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	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 Kinoshita Mitsuhiro, Nakajima Kazuki, Yamamoto Sachio, Suzuki Shigeo	4. 巻 413
2. 論文標題 High-throughput N-glycan screening method for therapeutic antibodies using a microchip-based DNA analyzer: a promising methodology for monitoring monoclonal antibody N-glycosylation	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Analytical and Bioanalytical Chemistry	6. 最初と最後の頁 4727 ~ 4738
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1007/s00216-021-03434-0	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 Kinoshita Mitsuhiro, Yamada Keita	4. 巻 207
2. 論文標題 Recent advances and trends in sample preparation and chemical modification for glycan analysis	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis	6. 最初と最後の頁 114424 ~ 114424
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.jpba.2021.114424	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8件（うち招待講演 1件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 山本佐知雄, 鮎川立希, 高橋佑季, 木下充弘
2. 発表標題 光硬化性レクチン固定化アクリルアミドゲルを用いる糖鎖のアフィニティーマイクロチップ電気泳動法の開発
3. 学会等名 第29回クロマトグラフィーシンポジウム（沖縄）
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 山本佐知雄, 矢野祥子, 木下充弘
2. 発表標題 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濃縮・標識・分離システムの開発
3. 学会等名 第73回日本電気泳動学会総会（栃木）
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 山本佐知雄, 鮎川立希, 鈴木茂生, 木下充弘
2. 発表標題 多分岐マイクロチップとレクチン固定化アクリルアミドゲルを用いる糖鎖のアフィニティーマイクロチップ電気泳動法の開発
3. 学会等名 第34 回バイオメディカル分析科学シンポジウム（千葉）
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 山本佐知雄, 鮎川立希, 鈴木茂生, 木下充弘
2. 発表標題 光硬化性レクチン固定化アクリルアミドゲルを利用した糖鎖のアフィニティーマイクロチップ電気泳動法の開発
3. 学会等名 日本分析化学会第71年会（岡山）2022.9.14
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 谷の上顕太、寺口瑠果、山本佐知雄、木下充弘
2. 発表標題 増殖シグナル依存的な細胞外GlcN取り込み促進によるN-結合型糖鎖の高分岐化
3. 学会等名 第41回日本糖質学会年会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 山田佳太、木下充弘
2. 発表標題 マイナー酸性O-結合型糖鎖の解析
3. 学会等名 第41回日本糖質学会年会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 木下充弘、曾我部有司、坂本泉
2. 発表標題 マイクロチップ電気泳動法によるN-グリカンの高スループットスクリーニング
3. 学会等名 第40回日本糖質学会年会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 木下充弘
2. 発表標題 グライコムクスをエイジング研究に活かす
3. 学会等名 第33回バイオメディカル分析科学シンポジウム（招待講演）
4. 発表年 2021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
--	---------------------------	-----------------------	----

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
---------	---------