

糖タンパク質から直接糖鎖だけを調べる技術を開発

～MALDI グリコタイピング：バイオ医薬品等の研究開発や分子診断の迅速化と低価格化に期待～

ポイント

- ・糖タンパク質糖鎖の位置選択的切断と選択的イオン化を同時に実現する技術の開発に成功。
- ・前処理なしで糖タンパク質の糖鎖パターン解析と末端ペプチド配列解析を自在に切り替え解析可能。
- ・疾患診断やバイオ医薬品品質管理の迅速化（30分以内）と低価格化（数百円）への貢献に期待。

概要

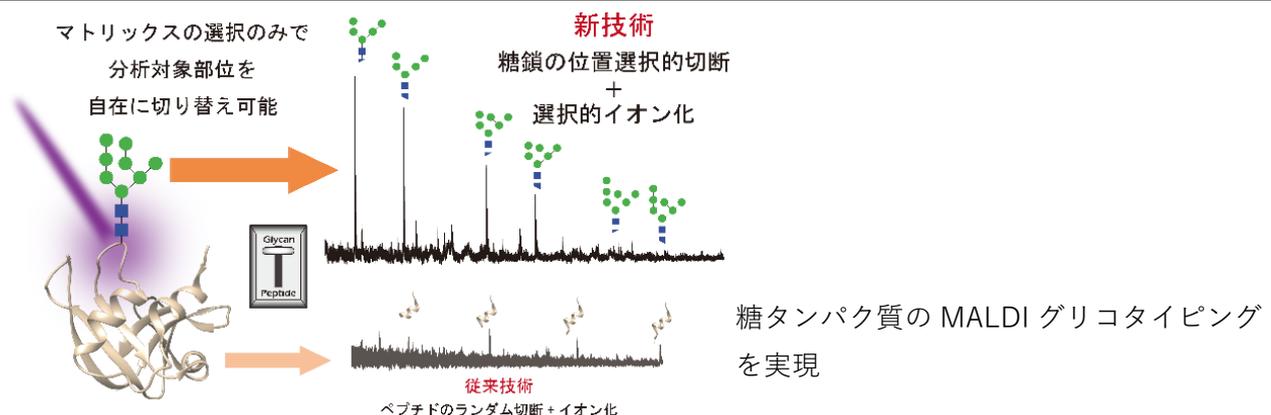
北海道大学大学院先端生命科学研究院の比能 洋教授らの研究グループは、糖タンパク質上の糖鎖の位置選択的切断と糖鎖選択的イオン化の同時実現により、直接糖鎖パターンだけを調べることができる MALDI グリコタイピング技術を発表しました。

タンパク質などの糖鎖修飾パターン情報は、血液型や感染症・共生菌宿主の決定など、それぞれの生物を特徴づける重要なバイオマーカーです。実際に糖鎖パターンの違いや変化を読み取る技術は、癌診断や治療効果の確認、再生医療における品質管理、バイオ医薬品の体内動態予測など、現在の生命科学の発展を支えています。しかし、糖タンパク質上の糖鎖パターン解析には、糖鎖の選択的切断と分離精製などの多段階の前処理工程が必要でした。

今回の研究では、研究グループが開発した糖鎖選択的イオン化を促進する質量分析用試薬（マトリックス）と糖タンパク質を混ぜるだけのマトリックス支援レーザー脱離イオン化質量分析法（MALDI-MS 法）*¹により、糖タンパク質上の糖鎖パターンを直接解析できることを発見しました。また、この発見に伴いマトリックスの選択のみで糖タンパク質のペプチド配列解析と糖鎖パターン解析を自在に切り替えながら構造全体を調べることが可能となりました。

質量分析技術は測定対象物に含まれる分子群のパターンをまとめて解析できるため、食品衛生管理や輸入品、ドーピング等の検査現場では対象分子ごとに高価な測定キットが必要な PCR や抗原・抗体検査から質量分析への転換が進行しています。しかし、糖タンパク質の糖鎖パターン情報の直接解析は糖鎖のイオン化効率が低く、ペプチドイオン情報にかき消されるため、実現困難と考えられていました。本技術は分子診断技術の転換を加速する技術となることが期待されます。

なお、本研究成果は Analysis & Sensing 誌に、本文は 2021 年 12 月 14 日（火）、カバー写真は 2022 年 2 月 22 日（火）にオンライン掲載されました。



【背景】

あらゆる生命体はヒトが衣服を着るように糖鎖^{*2}パターン（糖衣）を外側にまとい、自己防衛と外部標識として生命の多様性維持に活用しています。糖タンパク質の糖鎖パターンも、体内におけるタンパク質の安定性と移動先の決定因子として生体内で利用されており、さらに生体間の免疫や感染制御の標的となっています。そのため、その糖鎖修飾パターン解析技術はバイオ医薬品等の開発と品質管理、医療現場等での迅速検査のためのバイオマーカー^{*3}として重用されています。

また、複雑な分子パターンの一斉解析が可能な感度と分解能をもつ質量分析^{*3}技術は、新世代生体分子診断（バイオタイピング）技術として急速に社会に普及しています。

しかし、糖鎖は糖タンパク質のような複合糖質または分子量分布をもつオリゴ糖や多糖として存在し、さらにペプチドや核酸などと比較してイオン化^{*4}効率が低いため、質量分析の対象分子として糖鎖を扱うためには切出し加工や精製などの多段階前処理工程が必須と考えられており、糖鎖研究者以外への技術普及が遅れていました。

【研究手法・成果】

研究グループは、糖鎖のイオン化効率を改善できる MALDI-MS 法のためのマトリックスとその利用法の探索を行っていました。その過程で、従来液体イオンマトリックスとして報告されていた成分が固体塩となると糖鎖のイオン化効率が劇的に向上すること、さらにアルカリ金属の添加によりイオン化の糖鎖選択性とインソース分解^{*5}の位置選択性が大幅に向上することを発見しました（PCT 単独出願技術）。

この発見により、糖タンパク質から直接糖鎖パターンと個々の糖鎖構造の解析ができるようになりました（図 1）。一般的に、糖鎖は同一条件ではペプチドよりもイオン化効率が低いと考えられていたため、質量分析による糖タンパク質の糖鎖解析では糖鎖の切り出しと精製分離を行い、必要に応じて糖鎖のイオン化効率を改善するための化学修飾を施す、という一連の前処理工程が常識となっています。これまで、この前処理工程の効率化を対象とした研究開発競争が世界中で行われてきました。

一方、糖タンパク質のインソース分解による末端ペプチド配列の直接解析技術（図 1a）は 20 年程前に報告され、その分解効率を改善した技術が現在広く利用されています。本研究では研究グループが発見した新しいマトリックスを糖タンパク質のイオン化に使用し、インソース分解が生じやすい条件で測定を行ったところ、糖タンパク質上の糖鎖がタンパク質との結合部位選択的に分解し、その結果生じた糖鎖断片のみがイオン化されることを見出しました。その結果、無処理の糖タンパク質とこのマトリックスを混ぜるだけで糖タンパク質の糖鎖パターン（図 1b）を取得できるようになりました。

この糖鎖パターンは、従来の酵素処理による糖鎖の位置選択的加水分解とアフィニティ分離による糖鎖の精製工程を経て得た精製糖鎖サンプルの質量スペクトルパターン（図 1c）と一致します。インソース分解が生じるような高エネルギー条件下では、ポストソース分解と呼ばれるさらなる分解反応が生じやすいことが知られています。そこで、ポストソース分解の影響が測定結果に反映されるリフレクトロンモード^{*6}と呼ばれる高分解能条件での測定結果（図 1b）と、影響を受けないリニアモードと呼ばれる低分解能測定の結果（図 1d）を比較すると、いずれも糖鎖パターンが一致しました。さらに、図 1b のスペクトルから特徴的な糖鎖断片分子量のイオンを選別し、より強い分解条件で測定を行った結果、選択した糖鎖断片の内部構造を示す断片イオンパターン（図 1e）が観察されました。大変興味深いことに、その断片化様式は元の糖鎖がタンパク質と結合していた部位（還元末端）における 1 段階目の断片化様式と異なっており、インソース分解で生じる最初の断片化の化学選択性が非常に高いことが実証されました。

【今後への期待】

この研究で実現した糖タンパク質糖鎖の直接解析法は、分析対象となる糖タンパク質(ng~pg)に対し、混合するマトリックス成分(約 1 μ g)を選択するだけで、従来の末端ペプチド配列解析技術との切り替えが自在にできます。そのため、糖タンパク質の翻訳後修飾を対象とした疾患関連バイオマーカー探索や糖タンパク質製剤の品質管理のための時間(データ取得まで数時間~数日 \rightarrow 30分以内)、コスト(数千円~数十万円 \rightarrow 数百円/回)、難易度(分解+精製+分析専用処理 \rightarrow 混ぜるだけ)をそれぞれ飛躍的に改善することができます。

本研究成果は「MALDI グリコタイピング」の実現により、血液型発見と輸血医療の発展のように、生命科学研究とその社会還元による社会システムのゲーム・チェンジに繋がる技術となることが期待されます。

【謝辞】

本研究は日本学術振興会科学研究費補助金、科学技術振興機構研究成果展開事業研究成果最適展開支援プログラム(A-STEP)トライアウト、及び公益財団法人 JKA 機械振興補助事業からの支援を受けて実施されました。

論文情報

論文名	Glycan Selective MALDI In-source Decay Analysis of Intact Glycoprotein (糖鎖選択的 MALDI インソース分解法による無処理糖タンパク質の解析)
著者名	浦上彰吾 ¹ , 比能 洋 ² (¹ 北海道大学大学院生命科学院, ² 北海道大学大学院先端生命科学研究院)
雑誌名	Analysis & Sensing (分析化学の専門誌)
DOI	10.1002/anse.202100040 (本文), 10.1002/anse.202200008 (カバー写真)
公表日	2021年12月14日(水) 本文, 2022年2月22日(水) カバー写真 (オンライン公開)

お問い合わせ先

北海道大学大学院先端生命科学研究院新薬探索研究分野 教授 比能 洋 (ひのうひろし)
TEL 011-706-9040 FAX 011-706-9042 メール hinou@sci.hokudai.ac.jp
URL <https://sites.google.com/eis.hokudai.ac.jp/hinou>

配信元

北海道大学総務企画部広報課 (〒060-0808 札幌市北区北8条西5丁目)
TEL 011-706-2610 FAX 011-706-2092 メール jp-press@general.hokudai.ac.jp

【参考図】

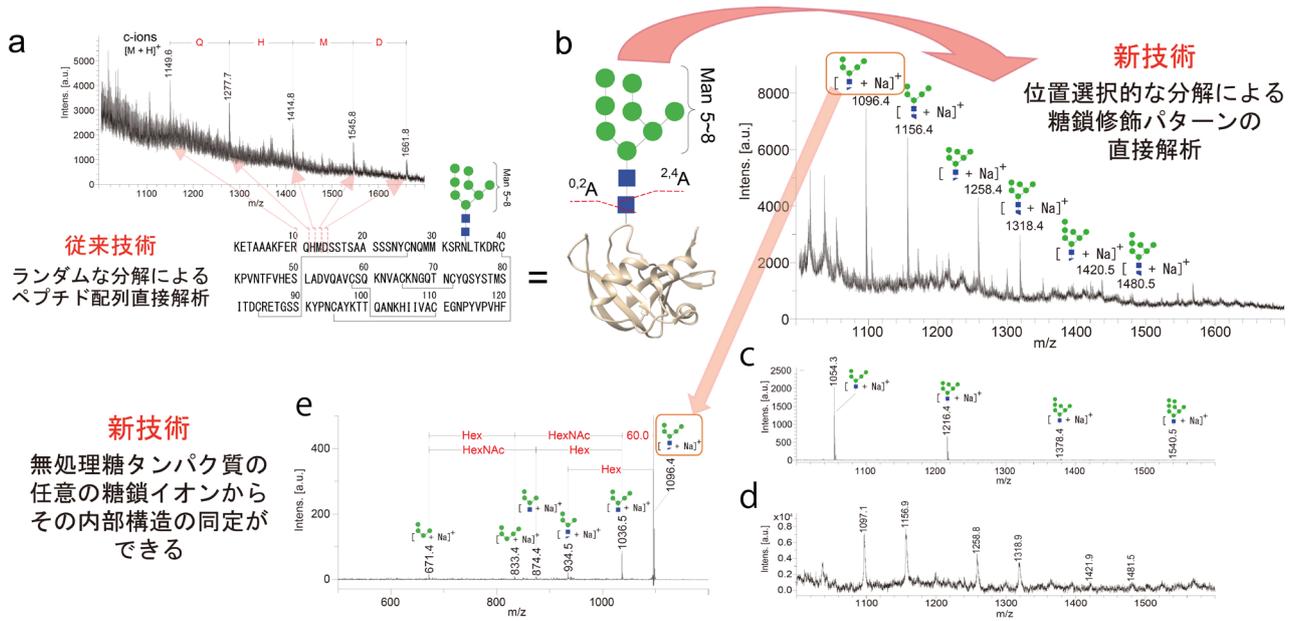


図 1 糖タンパク質から、直接糖鎖パターンと個々の糖鎖構造の解析が可能

- (a) 糖タンパク質からの直接末端ペプチド配列解析結果（従来技術）
- (b) 糖タンパク質からの直接糖鎖パターン解析（MALDI グリコタイピング）結果（新技術）
- (c) 糖タンパク質に対し酵素分解と糖鎖成分の分離精製を行った後の分析結果（従来技術）
- (d) 低分解能な測定モード下での MALDI グリコタイピング結果（新技術）
- (e) 特定の糖鎖イオンの内部構造を測定した結果（新技術 + 従来技術）

【用語解説】

- *1 マトリックス支援レーザー脱離イオン化質量分析法（MALDI-MS 法）… マトリックスと呼ばれる物質とアナライトと呼ばれる測定対象物質を混合し、レーザー照射エネルギーの吸収に伴うマトリックスの揮発化過程で高分子量のアナライトをソフトイオン化する技術。一価のイオンが形成しやすいため、イオンシグナルの解釈が比較的容易であり、混合物や分子量の分散性を有する高分子物質の分析に適している。マトリックスとアナライトの間に相性があり、マトリックスの選択により分析結果が大きく変化する。
- *2 糖鎖 … 糖が鎖状に繋がった分子でオリゴ糖とも呼ばれる。タンパク質や脂質と結合した複合糖質と呼ばれる状態で存在するものが多く、その構造解析には高度な知識と複雑な前処理工程が必要。
- *3 バイオマーカー … 生物の固有の特徴や疾患などの状態変化の指標となるもの。PCR や抗原抗体反応によるコロナウイルスの診断もコロナウイルスの持つ特徴的な分子配列を指標としている。
- *4 質量分析・イオン化 … 個々の分子の質量（重さ）を測定する技術。分子量決定のためにイオンが有する整数個の電荷を利用するため、得られた分子スペクトルは質量電荷比（ m/z ）で示される。糖鎖やタンパク質のような生体高分子の分析にはその分解を抑制するソフトイオン化技術が必要とされる。
- *5 インソース分解 … 測定対象分子をイオン化する際のエネルギーにより、対象分子の化学結合が切断される現象。MALDI-MS 法ではマトリックス分子の選択とレーザー照射パワーの選択によりその分解パターンを制御できる。イオン化後に分解する現象やその分解促進技術をポストソース分解と呼び、分析法（分子イオン取り扱い技術）の選択によりインソース分解と区別することが可能。
- *6 リフレクトロンモード … 生成した分子イオンを反射させてから計測する分析法。分解能が高い。