

補助事業番号 2018M-100

補助事業名 平成30年度 糖鎖自動合成マイクロアレイシステムの開発 補助事業

補助事業者名 北海道大学 比能 洋

1 研究の概要

マイクロアレイの超微小環境上で糖鎖修飾を行い、マイクロアレイ表面を乾かすことなくマイクロアレイの品質管理と機能解析が連続的に実施可能なシステムの開発を行った。

2 研究の目的と背景

任意の化合物をガラス等の基板の上にアレイ状に点着して作成されるマイクロアレイは遺伝子発現や配列解析分野で発展し、現在、様々な分野で応用されている。一方、タンパク質などの高次構造が関与する標的を観察する場合、洗浄や基板表面乾燥によりその高次構造が変化し、相互作用情報が失われることなどが問題となっていた。糖鎖や糖ペプチドなどの中分子は感染・免疫・分化・診断等の場面で重要なシグナル分子(バイオマーカー)である。また、中分子であるため溶液中での自由度が高く、マイクロアレイ提示後に乾燥状態で長期保存しても相互作用解析に必要な構造情報は失われないことから、医療現場やフィールドワークなど任意の場所で利用するバイオマーカーとして理想的である。しかし、相互作用相手がタンパク質であることから、解析操作を開始した後は相手分子であるたんぱく質の特性により、洗浄や乾燥による情報損失が大きくなる。本研究では糖鎖・複合糖質提示マイクロアレイに対し、基板表面を乾燥させることなくその表面修飾や相互作用情報の計測を可能なシステムを開発することにより、代表者らがこれまで蓄積した糖鎖自動合成と複合糖質提示型マイクロアレイ解析技術のノウハウを融合し、超微小環境で合成から品質管理、機能評価までを実現可能なシステムの構築を目的とする。

3 研究内容

(1) 小型・超小型マイクロアレイ観察装置の開発

マイクロアレイ上にマイクロピペッターによる分注操作により溶液交換やラベル化操作可能なマイクロ流路環境と、その操作中でも継続してマイクロアレイ観察が可能な光路環境を両立させることにより、代表者らが蓄積した糖鎖自動合成などの糖鎖修飾操作と通常のマイクロアレイ計測に必要な相互作用解析実験操作を同一環境にて実施可能なシステムの構築を行った。導電性シリコンゴム、マイクロ流路、高輝度LED、CADソフト、および3Dプリンタなどを組み合わせることにより観察装置を独自設計することにより、汎用性が高く、小型化可能な反応・相互作用実験用流路と計測・解析実験用光路を併せ持つシステムの構築に成功した。産業用カメラや、天体観測用カメラを使用し、オープンソースソフトで解析しながら装置設計を試行錯誤した結果、ノートパソコンおよびスマートフォン等のモバイル機器からの電源供給で計測・解析が可能な小型装置の作成に成功した。また、反応液流路を最適化することにより、計測を止めることなく、明環境下、計測環境の乾燥を伴わずに簡単なピペット操作にて任意のタイミングで任意の反応液をマイクロアレイ上に

供給できるシステムの構築に成功した。さらに、本システムを用いることにより、マイクロアレイ上の糖鎖および複合糖質(糖ペプチド)糖鎖の品質管理をラベル化レクチンにて実施可能であることを実証した。

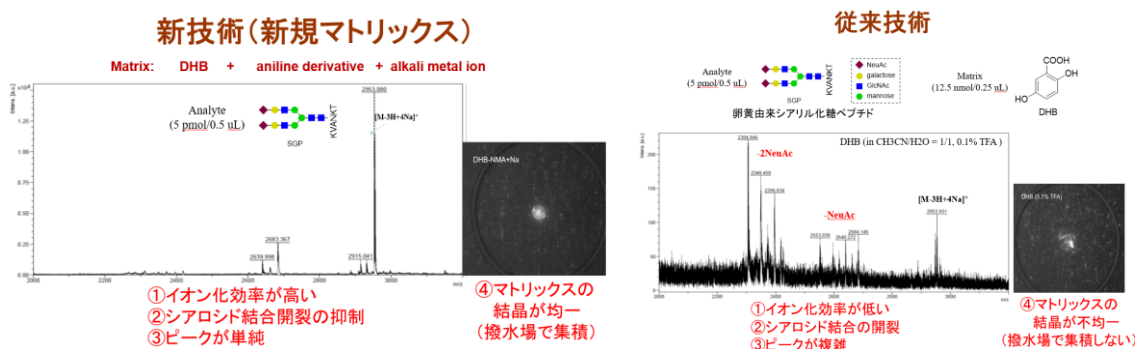


試作した独立電源型小型マイクロアレイ観察装置

(2) マイクロアレイ上の糖鎖・糖ペプチドの品質管理に必要な迅速高感度構造解析技術の開発

レクチンは生体内のような複雑系環境において糖鎖構造を解析するうえで有用な構造情報を与える有用なプローブ分子であるが、タンパク質の高次構造をその相互作用に利用しているため、その周辺環境に影響を受ける可能性がある。申請者はその糖鎖合成遺伝子の変異による機能異常が疾患に関与していることが報告されているO-マンノース型糖鎖を有する糖ペプチド類の糖鎖構造変化をレクチンにより追跡する研究を先行研究で実施しており、(1)の実験においてもこのO-マンノース型糖鎖を利用したところ、先行研究と同様の糖鎖構造—相互作用パターンを示した。しかし、この相互作用パターンのうち、特にシアリル化された糖鎖とレクチンの相互作用パターンでは試験した既知のシアリル酸特異的結合レクチン(SSAおよびMAM)は結合せず、シアリル酸とN-アセチルグルコサミンの双方を認識することで知られるコムギ由来レクチン(WGA)のみがシアリル化糖鎖結合性を示すことを再現することに成功した。この既知の相互作用パターンとの相違により査読者の理解が得られず、この研究の論文化が遅れていたが、この相互作用実験の再現に力を得て論文を再構成し投稿したところ、無事に採択された。代表者らは標準合成サンプルを用いて基礎データを取得しているため、その構造活性相関には自信を持っているが、この経験は蛍光強度の観測でその構造データを証明するという本課題の根幹が外部評価の際に疑われる可能性を示すものであり、これを実証できる他の分析手段と組み合わせる必要があった。しかし、マイクロアレイで必要なサンプル量は $10^{-14} \sim 10^{-19}$ molという極めて微量であり、そのレベルで構造解

析が可能な分析手段は質量分析に限られた。しかし、今回問題となったシアル酸を含有する糖鎖はイオン化の際にシアル酸の脱離を伴いやすいことから、これまで糖鎖の質量分析の世界ではシアル酸のカルボン酸を化学修飾しその脱離能を低減させてから計測することが常識となっていた。しかし、反応追跡法として使用する場合、化学修飾と精製工程を挟むことは本末転倒であり、その化学修飾を経ることなく構造解析(品質管理)が必要な方法論の開発が必要であった。そこで、我々のマイクロアレイ解析技術と同様にピペット操作のみで多数のサンプルや反応点の計測が可能なマトリックス支援レーザー脱離イオン化法(MALDI-TOFMS)に焦点を絞り、その際に使用するマトリックスと呼ばれる添加剤の改良を行った。近年、MALDI-TOFMSの新規マトリックスとして従来使用されている酸性マトリックスに有機塩基を添加することにより、様々なイオン性液体が発見され、特に糖鎖解析において数桁の感度向上を示すものも報告されていた。そこで、報告されている糖鎖解析用液体マトリックスを全て調査したが、遊離のシアル酸を分解することなく計測可能なものは見出すことができなかった。そこで、さらに金属添加材に着目し、種々検討した結果、シアル酸の脱離を伴うことなく、従来のマトリックスより100倍以上の感度でシアリル化糖鎖をイオン化できるマトリックスの発見に成功した。本発見は(6)に示した通り、特許出願し、さらに論文を投稿中である。



未修飾シアリル化糖鎖の直接解析のために開発した新規マトリックスの特徴

以上、当初目的とした糖鎖自動合成操作が実施可能なマイクロアレイ観測装置に加え、作成した糖鎖・複合糖質の多元的構造解析を可能とする質量分析技術の開発に成功した。これらの技術は今後の糖鎖・複合糖質マイクロアレイを含む糖鎖機能解析研究の基盤技術として基礎研究に加え医療などへの応用分野にも積極的に利用されることが期待される成果である。

4 本研究が実社会にどう活かされるかー展望

生体内における糖鎖構造変化はがん診断をはじめとして様々な疾患のバイオマーカーとして長年臨床の現場で利用されてきた。しかし、その対象分子が糖ペプチド(糖タンパク)である場合、精密構造の再構築の難易度が極めて高いため、その診断精度の向上や応用研究に使用することが困難であった。本研究成果により、超微量の糖ペプチドを自在に修飾し、そのまま生成物の品質管理と機能解析が実施できるようになることにより、生命科学における糖鎖機能の解明とともに、

医療分野において糖鎖による翻訳後修飾機能の利用が促進されることが期待される。

5 教歴・研究歴の流れにおける今回研究の位置づけ

研究代表者はこれまで糖ペプチドを中心とする複合糖質の迅速合成法の開発とその利用に関する研究に従事してきた。特に、その合成において固相化学合成技術と液相酵素合成技術を高度に融合することにより、通常の合成技術では調整が困難であった複合糖質構造の精密合成とそのライブラリ化に成功しており、このライブラリを用いた機能解析法の一環としてマイクロアレイ法を利用してきた。今回の研究により、マイクロアレイ解析に必要なサンプル量レベルで糖鎖配列の再構築および生成物の品質管理と機能解析を一貫して実施可能となったことにより、合成技術ベースの糖鎖機能研究が大きく進展することが期待される。

6 本研究にかかわる知財・発表論文等

(知財)

発明者:比能 洋

出願人:北海道大学

特願 2019-011457

「未修飾シアリル化複合糖質および糖ペプチドのリフレクトロンモードMALDI-TOFおよびTOF/TOF質量分析のためのアニリン誘導体/DHB/アルカリ金属マトリックス組成物」

出願日:2019年(平成31年)1月23日

(発表論文)

Hinou H.,* Kikuchi S., Ochi R., Igarashi K., Takada W., Nishimura S.-I. “Synthetic glycopeptides reveal specific binding pattern and conformational change at *O*-mannosylated position of α -dystroglycan by POMGnT1 catalyzed GlcNAc modification” *Bioorganic&Medicinal Chemistry in press*. DOI: [org/10.1016/j.bmc.2019.05.008](https://doi.org/10.1016/j.bmc.2019.05.008)

<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0968089619304250>

7 補助事業に係る成果物

(1)補助事業により作成したもの

該当なし

(2)(1)以外で当事業において作成したもの

比能 洋 「未修飾シアリル化糖鎖および複合糖質の高感度・高分解能構造解析を実現するMALDIマトリックス」北海道大学研究シーズ集

https://seeds.mcip.hokudai.ac.jp/jp/view/381/?fbclid=IwAR23kEmvZ1jZqdpbLFwOVadK2JH4z30qSKHanAgqR40o_CeKTh8UTe_j5VE

8 事業内容についての問い合わせ先

所属機関名： 北海道大学（ホッカイドウダイガク）

住 所： 〒001-0021

札幌市北区北21条西11丁目

担 当 者： 教授 比能 洋（ヒノウヒロシ）

担 当 部 署： 大学院先端生命科学研究院

（ダイガクインセンタンセイメイカガクケンキュウイン）

E - m a i l: hinou@sci.hokudai.ac.jp

U R L: <http://altair.sci.hokudai.ac.jp/g4/>