

キャピラリーアフィニティ電気泳動による糖鎖解析法とその展開

掛樋一晃

近畿大学薬学部創薬科学科 生物情報薬学研究室

複合糖質糖鎖を網羅的に解析する構造グライコミクスの必要性が提唱され10年以上が経過した。その間、キャピラリー電気泳動法（CE）などの超高分解能分離技術や質量分析法、レクチンマイクロレイなどの技術革新により構造グライコミクスに挑戦できる体制が整備された。本講演では、著者らが開発してきた定量性、網羅性、高感度を兼ね備えた構造グライコミクス手法であるキャピラリーアフィニティ電気泳動法（CAE）による糖鎖解析法とその展開について紹介する。

I. キャピラリーアフィニティ電気泳動

キャピラリーアフィニティ電気泳動（CAE）は自由溶液中における分子間相互作用とCEによる分離分析を組み合わせた方法であり、糖鎖-タンパク質間相互作用のように弱い相互作用の解析に適している^{1),2)}。CAE法はリガンド分子の固定化や複雑な糖鎖混合物の分離精製を必要とせず、蛍光標識糖鎖混合物を糖結合性タンパク質（レクチン）を含む緩衝液中で電気泳動を行い、相互作用に基づく糖鎖の泳動速度の変化を指標として糖鎖構造を解析する画期的な手法である。また、レーザー励起蛍光検出による高感度検出を達成できることも特筆すべき点である。

II. CAE法を用いる糖タンパク質糖鎖プロファイリング

糖タンパク質糖鎖の解析では糖鎖特有の分枝構造を識別しながら、さらに質量分析法では区別が難しい結合異性体を識別しなければならない。一方、レクチンを用いれば分枝構造、シアル酸やフコース、ガラクトースなどの末端修飾の違いを容易に識別できる。我々は糖タンパク質糖鎖を効率よくプロファイリングするための11種類のレクチンセット用い、6時間以内に糖鎖混合物中の各糖鎖構造を解析する手法を開発した¹⁾。本手法を用いれば、プロテオミクス等で取り扱うpmolレベル以下の糖タンパク質中の糖鎖プロファイリングにも適用可能であり、糖鎖疾患マーカーの探索等へ応用できる技術としても期待できる。

III. CAE 法を利用する糖鎖-タンパク質間相互作用の速度論解析

糖鎖-タンパク質間相互作用の特徴として、その親和性が結合定数として $10^4 \sim 10^6 \text{M}^{-1}$ 程度と弱い点が挙げられる。CAE 法はこのように弱い相互作用の解析に適している。緩衝液中のタンパク質濃度を段階的に変更しながら解析すれば、結合定数の算出などの速度論解析も可能である^{3),4)}。我々は CAE 法を用いて独自に発見したチューリップ球根レクチンと N 結合型糖鎖との相互作用解析を行い、結合定数に基づきレクチンの糖結合特異性を詳細に解析した。

IV. CAE 法の様々なアプリケーション

IVa. レクチンの糖結合特異性のライブラリー化

糖鎖解析ツールとしてレクチンを活用するためには、多くの構造既知の糖鎖とレクチンとの相互作用を解析し、個々の糖鎖に対する相互作用情報をライブラリーとして蓄積しておくことが重要である。我々は構造既知のミルクオリゴ糖混合物を用いてレクチンとの相互作用解析を行い、ルイス型および血液型糖鎖抗原に対する相互作用情報をライブラリー化し、未知のオリゴ糖の構造解析へ応用した⁵⁾。

IVb. CAE 法を利用するレクチン活性のスクリーニング

CAE 法はタンパク質粗抽出物中のレクチン活性のスクリーニングにも有効である⁶⁾。構造既知の糖鎖混合物をタンパク質粗抽出物を含む緩衝液中で電気泳動を行うことで、糖との親和性の弱いものや微量のレクチン活性でもその活性を見落とすことなく簡便にスクリーニングできる。また、微量スケールのスクリーニングが可能であるため、大量入手が困難な天然物や動物レクチン等のスクリーニングにも適した手法である。

V. 今後の展望

CE による糖鎖解析例は HPLC や質量分析法に比べ少ないが、感度、分離能、スループットの点では HPLC や質量分析法を凌ぐ優位性を持ち、糖タンパク質性バイオ医薬品の品質管理技術としても需要が高まりつつある。また、CE で開発した方法論はマイクロチップ電気泳動法にも容易に移植できるため、解析の更なる高速化を達成しうる分離分析手段の一つであり、糖鎖解析に劇的な進展をもたらす技術として生命科学研究に果たす役割への期待も大きい。

文献

1) Nakajima K, Oda Y, Kinoshita M, Kakehi K., J Proteome Res. 2003 2, 81. 2) Kakehi K, Kinoshita M., Methods Mol Biol. 2009, 534:93. 3) Oda Y, Senaha T, Matsuno Y, Nakajima K, Naka R, Kinoshita M, Honda E, Furuta I, Kakehi K., J Biol Chem. 2003, 278, 32439. 4) Kinoshita M, Kakehi K., J Chromatogr B 2005, 816, 289. 5) Nakajima K, Kinoshita M, Matsushita N, Urashima T, Suzuki M, Suzuki A, Kakehi K., Anal Biochem. 2006, 348, 105. 6) Nakajima K, Kinoshita M, Oda Y, Masuko T, Kaku H, Shibuya N, Kakehi K., Glycobiology. 2004, 14, 793.