糖鎖の違いで糖タンパク質を見分ける新技術

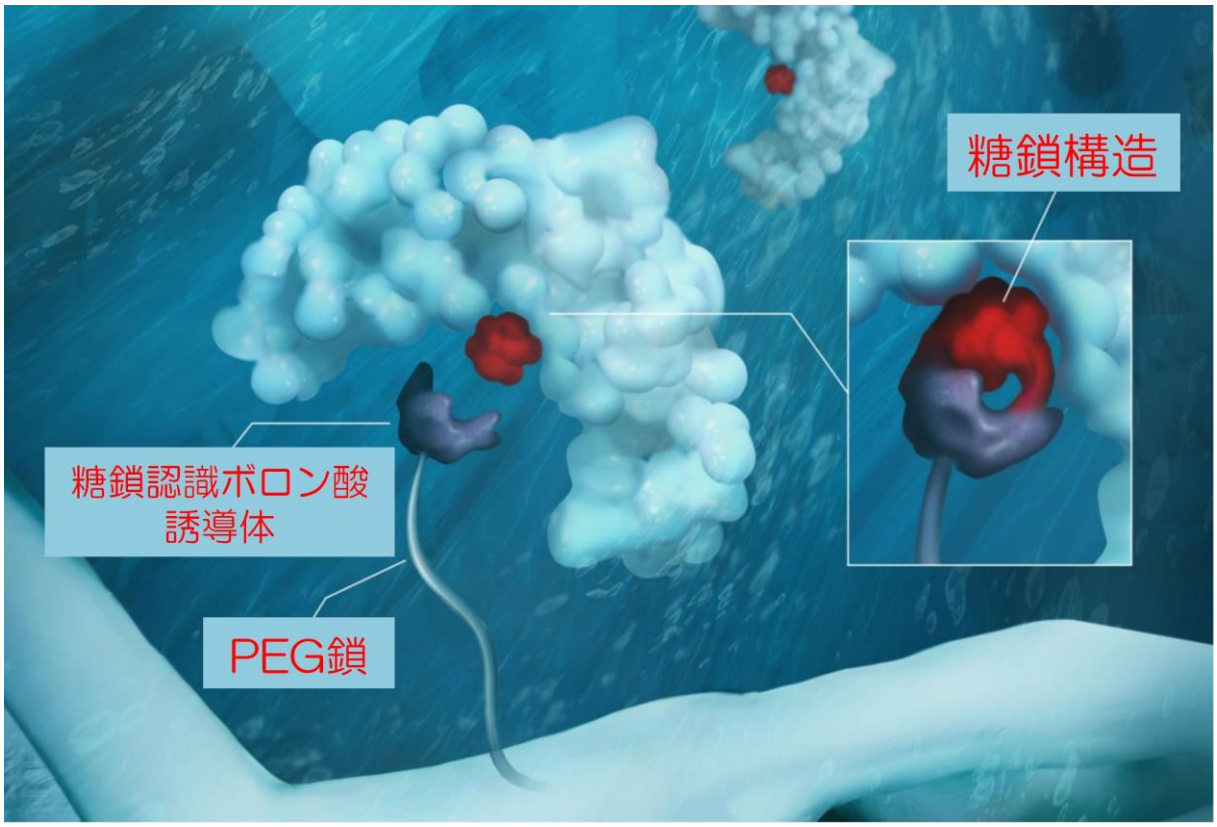
―抗体分離，ウイルス変異検出の高度化―

概要

オプジーボに代表される抗体医薬品[注1]は、近年全世界で研究開発が活発化しています。抗体はタンパク質と糖鎖で構成されており、通常、そのタンパク質の違いのみで見分けられて分離・精製されています。そのため、現在利用されている抗体成分には、異なる糖鎖が含まれている可能性があります。さらに、昨今のコロナウイルスに関しても、変異種のスパイクタンパク質の糖鎖構造が異なることが報告されています。一方で、既存の分離技術では、糖タンパク質（抗体もスパイクタンパク質も）を糖鎖の違いで分離することはできません。

京都大学大学院工学研究科 久保拓也 准教授、大塚浩二 同教授、京都大学化学研究所 高谷光 准教授（研究当時、現：帝京科学大学教授）、信和化工株式会社 小林宏資 氏らの共同研究グループは、糖タンパク質を糖鎖で見分ける新たな分離手法を開発しました。糖鎖と特異的に作用するボロン酸[注2]誘導体とポリエチレングリコールの複合体を用いた分離剤を開発し、糖タンパク質の選択的分離に成功しました。本技術は、今後、薬効の高い抗体医薬品開発やウイルス変異種の迅速な検出など、幅広い分野における応用への発展が期待されます。

本研究成果は、2022 年 4 月 26 日（現地時刻）に米国の国際学術誌「Analytical Chemistry」にオンライン掲載されました。



ポリエチレングリコールの先のボロン酸誘導体が糖タンパク質の糖鎖を捕まえるイメージ図

１．背景

オプジーボに代表される抗体医薬品は、がん細胞表面の目印となる抗原をねらい撃ちするため、高い治療効果と副作用の軽減が可能であり、近年全世界で研究開発が活発化しています。抗体はタンパク質と糖鎖で構成されており、通常、そのタンパク質の違いのみで見分けられて分離・精製されています。そのため、現在利用されている抗体成分には、異なる糖鎖が含まれている可能性があります。しかし、抗体に含まれる糖鎖は、細胞認識や構造安定性などの重要な役割を担っているため、抗体の糖鎖の違いを見分ける技術は、次世代の抗体研究のカギとなると予想されます。さらに、昨今のコロナウイルスに関しても、変異種間のスパイクタンパク質の糖鎖構造が異なることが報告されています。

一方で、既存の分離技術では、糖鎖とタンパク質で構成される糖タンパク質（抗体もスパイクタンパク質も）を糖鎖の違いで分離することはできません。現行法では、高速液体クロマトグラフィー（HPLC）等によって、タンパク質の特性のみで分離が行われるため、脂溶性で高分子量のタンパク質内部の糖鎖を見分けることは不可能です。そのため、精製糖タンパク質として販売されている製品には極めて多くの糖鎖バリエーションが混在しており、糖鎖の異なる糖タンパク質の混合成分である可能性があります。

そこで本研究グループでは、糖鎖を認識するボロン酸誘導体と生体適合性の高い高分子であるポリエチレングリコール（PEG）に着目し、糖タンパク質の糖鎖のみを識別する新たな分離基材の開発を着想しました。その結果、作製した分離基材を用いることで、糖鎖をもつタンパク質のみが選択的に分離され、さらに、特定の糖鎖を含む糖タンパク質の分離にも成功しました。

２．研究手法・成果

過去の多くの研究において、ボロン酸及びその誘導体が糖鎖と特異的な相互作用を示すことが知られていました。また、ポリエチレングリコール（PEG）は、親水性が高く生体親和性の高い合成高分子として知られており、生体材料やドラッグデリバリーなど、多くの研究に利用されています。本研究では、この二つの機能をうまく組み合わせることによって、タンパク質内部に存在する糖鎖を識別できるボロン酸－PEG 複合体を合成し、さらに、分離基材表面に固定化することで、クロマトグラフィー用の分離カラムとして利用しました。図 1 に示すように、シリカゲル粒子の表面に PEG を結合させ、さらに、ボロン酸誘導体密度を向上させるために、ポリエチレンイミンを結合したのち、ボロン酸誘導体反応させることで、高密度のボロン酸誘導体を結合させることに成功しました。得られた粒子を HPLC 用のカラムに充填して、タンパク質と糖タンパク質を分析した結果、効果的な糖鎖認識によって、糖タンパク質だけが強く保持されることが明らかになりました。さらに、図 2 にしめすように、糖鎖を持たない牛血清アルブミン（BSA）と糖鎖を持つ西洋ワサビペルオキシダーゼ（HRP）の混合物を分析した結果、単純な pH の切り替えによって、HRP を選択的に分離することが可能になりました。

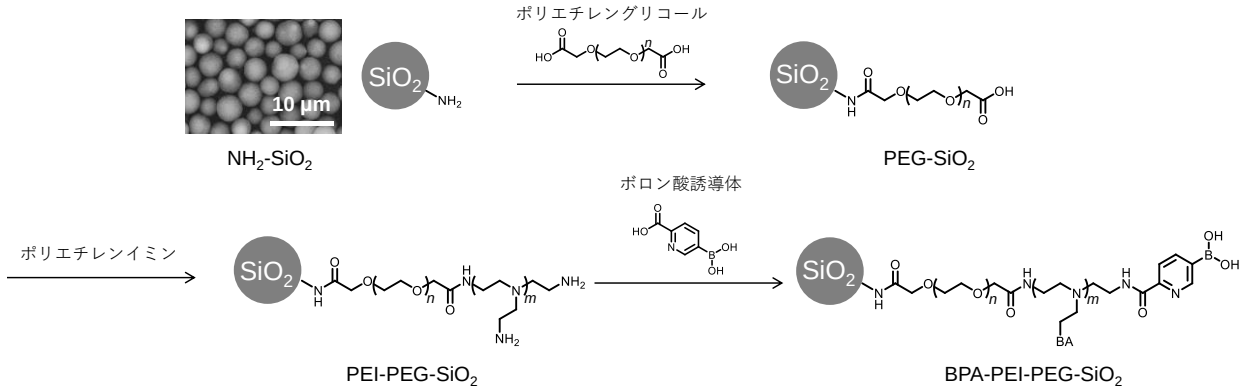


図 1．PEG とボロン酸誘導体を結合したシリカゲルの合成

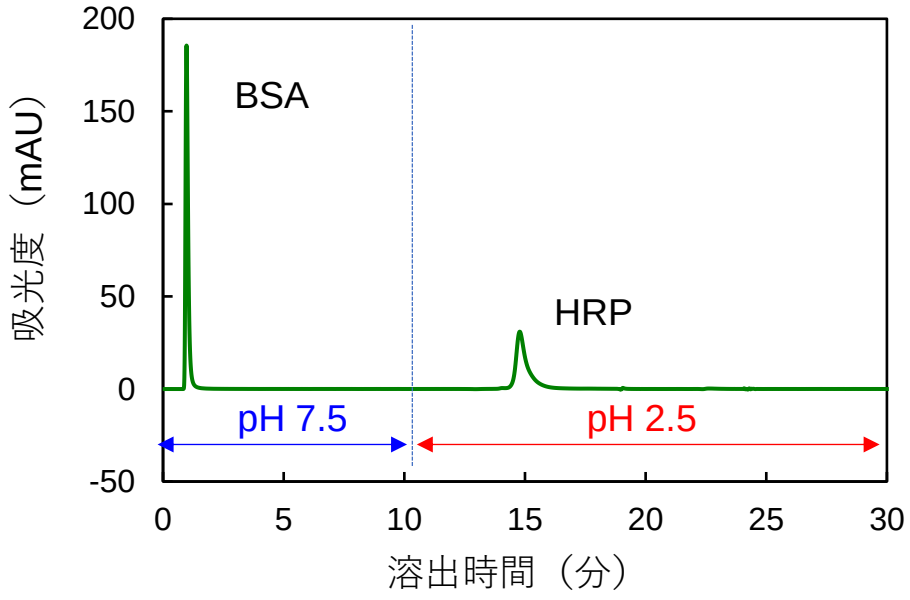


図 2．BSA と HRP の分離（糖鎖を含む HPR の選択的分離）

3．波及効果、今後の予定

糖タンパク質の糖鎖を見分ける本技術の発展は、これまで確認できなかった糖鎖の違いに基づく薬理効果の差異を見分ける革新的な分離技術の創出にも寄与することが予想されます。また、すでに市販されているバイオ医薬品に関しても、糖鎖の劣化や変性をモニタリングするための品質管理手法として有効であると考えられます。さらには、現在の新型コロナウイルスに対して、ウイルス表面の糖タンパク質の糖鎖構造の違いを迅速に見分けることによって、変異種の検出及びワクチン開発など、ポストコロナ社会にも貢献することが期待できます。

4．研究プロジェクトについて

本研究は、JST 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 産学共同、JPMJTR214C 及び JST CREST、JPMJCR17H2 の支援を受けて行われました。

＜用語解説＞

注 1 抗体医薬品：分子標的治療薬のひとつであり、抗原－抗体反応を利用するため、特定の細胞を標的にした治療に効果的です。そのため、高い治療効果と低い副作用が期待されており、次々と新たな医薬品が開発されています。

注 2 ボロン酸：ホウ酸の水酸基をアルキル基やアリール基で置換したものであり、炭素－ホウ素結合を含んでいる化合物です。特に、糖鎖と可逆な共有結合錯体をつくることが可能であり、糖鎖の分離や検出に有効です。

＜研究者のコメント＞

糖タンパク質の糖鎖に基づく分離は、以前から広い分野で必要とされてきました。本研究成果は、その可能性を示すものであり、より安全で安価な抗体医薬品の開発支援に加え、新型コロナウイルス等新たな病原体の糖

タンパク質に基づく感染や増殖メカニズムの解明を促進し、食品や農学分野ではより健康な食生活、安全で安定的な食糧の開発や供給を支援できる新たなツールになると期待できます。（久保拓也）

＜論文タイトルと著者＞

タイトル：Separation of glycoproteins based on sugar chains using novel stationary phases modified with PEG-conjugated boronic-acid derivatives（ポリエチレングリコール複合型ボロン酸誘導体を修飾した新規分離剤を用いた糖鎖に基づく糖タンパク質の分離）

著　　者：Hiroshi KOBAYASHI, Yusuke MASUDA, Hikaru TAKAYA, Takuya KUBO, Koji OTSUKA

掲 載 誌：Analytical Chemistry　DOI：10.1021/acs.analchem.2c01002