

糖鎖微量迅速解析システムの開発

— 誰でも簡単に糖鎖を調べることができる時代へ —

亀山 昭彦^{1*}、菊池 紀広²、中家 修一³、船津 慎治³

糖鎖構造解析は専門家が職人芸で行ってきた、いわば匠の技であり、そのことが糖鎖研究普及の一つの大きなボトルネックになっていた。誰でも簡単に糖鎖構造解析ができるようになれば、糖鎖研究の裾野が広がり、謎に包まれた糖鎖の機能解明とその応用が急速に進展することが期待される。糖鎖研究の基盤構築の一つとして取り組んだ糖鎖多段階タンデムMSスペクトルデータベースの構築と、それを活用した糖鎖微量迅速解析システムの開発について述べる。

キーワード: グライコミクス、質量分析、データベース、構造解析、アルゴリズム、ライブラリー、異性体

Development of a rapid analytical system for glycans using a multistage tandem mass spectral database

– Toward an era where everyone can analyze glycan structure without specialist knowledge –

Akihiko KAMEYAMA^{1*}, Norihiro KIKUCHI², Shuuichi NAKAYA³ and Shinji FUNATSU³

Conducting glycan analysis requires expertise. This requirement has been a major bottleneck in the progress of glycomics. If glycan analysis can be done easily and rapidly without specialist knowledge, then the development of glycan functional analysis and associated applications is expected to accelerate. Here, we describe the construction of a multistage tandem mass spectral database, and a system for rapid glycan analysis that utilizes this database, as examples of infrastructure development for the advancement of glycoscience.

Keywords: Glycomics, mass spectrometry, database, structural analysis, algorithm, library, isomer

1 はじめに

糖鎖工学という用語に多くの読者は馴染みがないかもしれない。実はこの用語が誕生してからすでに四半世紀が過ぎている。核酸とタンパク質の科学を基礎として発展した遺伝子工学やタンパク質工学がバイオテクノロジーとして社会に大きなインパクトを与え始めた頃、第3の生命鎖である糖鎖に関する知識の欠如が問題となった。そのような状況を背景に糖鎖生物学という学問領域が生まれ、さらにそれをバイオテクノロジーの分野へ積極的に利用していこうという考えのもとに糖鎖工学という概念が我が国で生まれた。その旨は、1992年に発刊された「糖鎖工学」(産業調査会発行)の冒頭に記載されている^[1]。その後、約10年を経て国立研究開発法人新エネルギー・産業技術総合開発機構(NEDO)の「糖鎖遺伝子ライブラリー構築プロジェ

クト」が発足し、続いて「糖鎖エンジニアリングプロジェクト」、そして「糖鎖機能活用技術開発プロジェクト」と10年にわたる糖鎖プロジェクトが成松久プロジェクトリーダーの下で精力的に進められた。臨床診断薬の製品化に至るまでのその成果は、本誌2012年第3号に掲載された「糖鎖研究のための基盤ツール開発およびその応用と実用化」にまとめられている^[2]。一般社会へ向けたアウトプット第1号は臨床診断薬として結実したが、この壮大な研究プロジェクトの成果はそれにとどまらない。ライフサイエンスに欠落していた糖鎖の研究基盤、すなわち「合成」「構造」「機能」に関するインフラストラクチャーを整備したことは重要な成果の一つである。四半世紀前に提案された糖鎖工学が実質的にスタートするのはこれからであろう。

糖鎖の構造解析は難しいといわれる。その大きな理由

1 産業技術総合研究所 創薬基盤研究部門 〒305-8568 つくば市梅園1-1-1 中央第2、2 三井情報株式会社 事業開発部 〒105-6215 港区愛宕2-5-1 愛宕グリーンヒルズ MORI タワー (現所属: バイエル薬品株式会社 オープンイノベーションセンター 〒100-8265 千代田区丸の内1-6-5 丸の内北口ビル)、3 株式会社島津製作所 分析計測事業部 〒604-8511 京都市中京区西ノ京桑原町1-1. Biotechnology Research Institute for Drug Discovery, AIST Tsukuba Central 2, 1-1-1 Umezono, Tsukuba 305-8568, Japan * E-mail: aki-kameyama@aist.go.jp, 2. Business Development Division, Mitsui Knowledge Industry Co., Ltd. Atago Green Hills Mori Tower 2-5-1 Atago, Minato-ku 105-6215, Japan (Present address: Bayer Yakuhin, Ltd. Open Innovation Center Japan 1-6-5 Marunouchi, Chiyoda-ku 100-8265, Japan), 3. Analytical & Measuring Instruments Division, Shimadzu Corporation 1 Nishinokyo Kuwabara-cho, Nakagyo-ku, Kyoto 604-8511, Japan

Original manuscript received December 24, 2014, Revisions received June 22, 2015, Accepted June 25, 2015

は、配列を読み取れば一次構造がわかる核酸やタンパク質とは異なり、糖鎖には分枝構造や位置異性、立体異性等が存在し、単純な配列解析が通用しないからである(図1)。つまり、異性体の判別をいかに行うか、これが糖鎖解析の要である。糖鎖構造解析の難しさは本誌2014年第2号の「糖鎖プロファイリング技術がもたらすパラダイムシフト」にも記載されているが^[3]、要するに糖鎖構造解析は専門家が職人芸で行ってきた匠の技であり、そのことが糖鎖研究の一つの大きなボトルネックになっていた。誰でも簡単に糖鎖構造解析ができるようになれば、糖鎖研究の裾野が広がり、謎に包まれた糖鎖の機能解明とその応用が急速に進展することが期待される。糖鎖エンジニアリングプロジェクトでは、糖鎖の構造解析に対して二つのアプローチをとった。一つは、糖鎖の部分構造を認識するタンパク質(レクチン)をスライドガラス上に多種類並べたレクチンアレイを用いる糖鎖プロファイリング法である^[4]。この手法は、疾患バイオマーカー探索や幹細胞マーカー探索において次々と成果を出してきた^{[5][7]}。精度よりも感度が要求されるマーカー探索の研究には、高感度で前処理も簡便なレクチンマイクロアレイが有効に活用された。一方で、分子レベルでマーカー本体を明らかにしたり、多種類の糖鎖の含量を一度に調べたいときなどはこの論文で紹介する質量分析による糖鎖解析が力を発揮する。両者は方法論としてのそれぞれの弱点を相互に補完する関係にある。この論文では糖鎖構造解析に関するインフラストラクチャー整備の一つとしての糖鎖多段階タンデムMSスペクトルデータベースの構築とそれを活用した糖鎖微量迅速解析システムの開発について論じる。

2 質量分析計による糖鎖構造解析

エレクトロスプレーイオン化法(ESI)とマトリクス支援レー

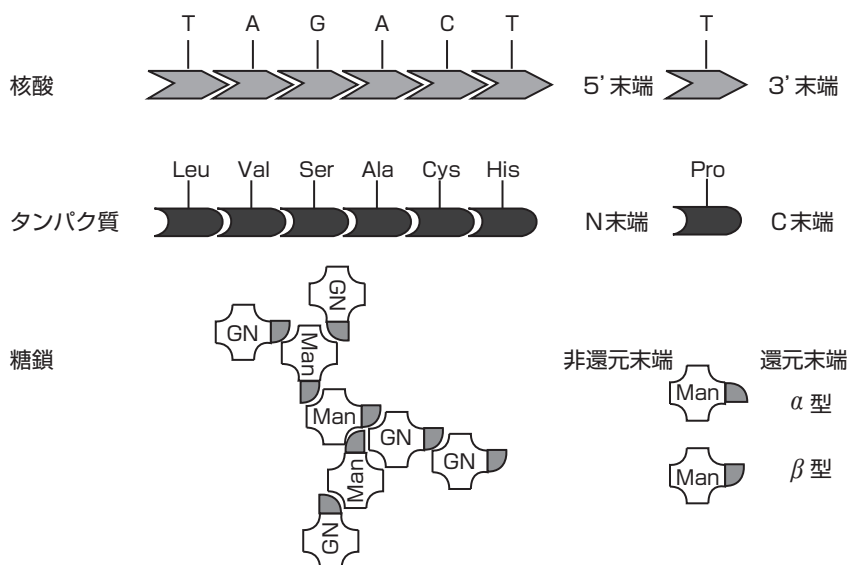


図1 糖鎖の配列解析が難しい理由
糖鎖では糖の還元末端と非還元末端が結合する。非還元末端に結合部位(扇形の凹にて表現)が4ヶ所、還元末端の結合部位(扇形の凸にて表現)には α と β の立体異性がある。このため枝分かれ構造を含む複雑な異性体ができる。

ザー脱離イオン化法(MALDI)の二つのソフトイオン化法の開発以降、質量分析計は急速にライフサイエンス分野での活用が進み、現在ではプロテオーム解析の他、薬物動態解析、バイオマーカーの探索、微生物同定等において広く利用されるようになってきている。この研究を開始した2000年代初頭にはポストゲノム研究としてのプロテオーム解析が華々しく登場した時代であり、その中心的役割を果たす質量分析計は日進月歩の勢いで進化していた。当時の糖鎖構造解析は高速液体クロマトグラフ(HPLC)で分析した際の種々の糖鎖に関する保持時間のデータベースを用いる方法が主流だった。しかし、精密なデータが迅速かつ高感度に得られる点で、質量分析計がHPLCを用いた糖鎖構造解析にとって代わることは必然の流れと考えられた。そのような背景の中、プロジェクト開始の前年に(株)島津製作所の田中耕一氏が産総研糖鎖工学研究センターを訪れ、英国で開発した新型の質量分析計であるMALDI-イオントラップ飛行時間型質量分析計(MALDI-QIT-TOF MS)を紹介した(図2)。この質量分析計はMALDIでイオン化するため糖鎖は1価イオンとなり、またイオントラップにより多段階の衝突誘起解離(CID)が可能で、さらにTOFによる質量分析のため分解能も高い。これらの性質は、高感度で異性体を判別する必要がある糖鎖構造解析に適した特長であるといえる。そこで、プロジェクトではこの装置を用いた新たな糖鎖構造解析法を開発することとなった。

2.1 研究開始当初における開発動向

質量分析計を用いた糖鎖の精密な構造解析では、糖鎖のOH基、NH基、COOH基をすべてメチル化(完全メチル化という)した後、高速原子衝撃イオン化型質量分析計(FAB-MS)の高エネルギーCID^[用語1]により得られたフラグメントイオンを詳細に解析する方法が採られていた。この方法は世界でも限られた数の糖鎖質量分析専門家が

行っていたものであり、2000年代初頭のおミクス^{用語2}ブームの中では、この方法に代わる新たな簡便手法が模索されていた。实用レベルで先行していたのは、既報の糖鎖構造すべてについて計算上のフラグメントリストを作成し、それを集積したデータベースに、分析対象糖鎖のMS²スペクトルのピークリストを参照する方法である。この方法は簡便ではあるが、糖鎖分析の要である異性体の判別はできない。異性体を含めた判別を可能とする方法は、ニューハンプシャー大学で研究が進められていたが、彼らの方法は糖鎖を完全メチル化してから分析するものであった^{[8]-[10]}。完全メチル化は専用の装置もキットも販売されておらず、専門外の人には難しい誘導体化法である。

2.2 目標とアウトカム

我々の目標は、誰でも簡単に異性体の判別を含めた糖鎖解析を行うことができる新たなシステムの開発とその製品化である。このようなシステムを世に出すことにより、これまで糖鎖を敬遠してきた多くのライフサイエンス研究者にとって糖鎖分析が身近なものとなり、同時に糖鎖を調べる

人口が増えることにより、これまで知られていなかった糖鎖の新たな機能や糖鎖バイオマーカー等の発見を加速することが期待される。そして、新たな糖鎖機能の知見がさらなる技術開発の呼び水となり、名実共に糖鎖工学がライフサイエンスの研究現場に広がっていく、そのようなアウトカムを描いた。

3 糖鎖微量迅速解析システム開発のシナリオ

目標を達成するためのシナリオがはじめてあった訳ではない。MALDI-QIT-TOF MSは新しい形式の質量分析計であったため、その装置で糖鎖を分析した場合にどのようなデータが得られるかは測定してみないと分からなかったからである。当初は、多数の糖鎖を分析することによりフラグメンテーションの法則を見だし、それを元にMSⁿ^{用語3}スペクトルから構造推定を行うというアイデアもあった。これについては産総研生命情報科学研究センターとも連携し、研究レベルではいくつかの成果を得たが実用化には結びついていない^{[11][13]}。

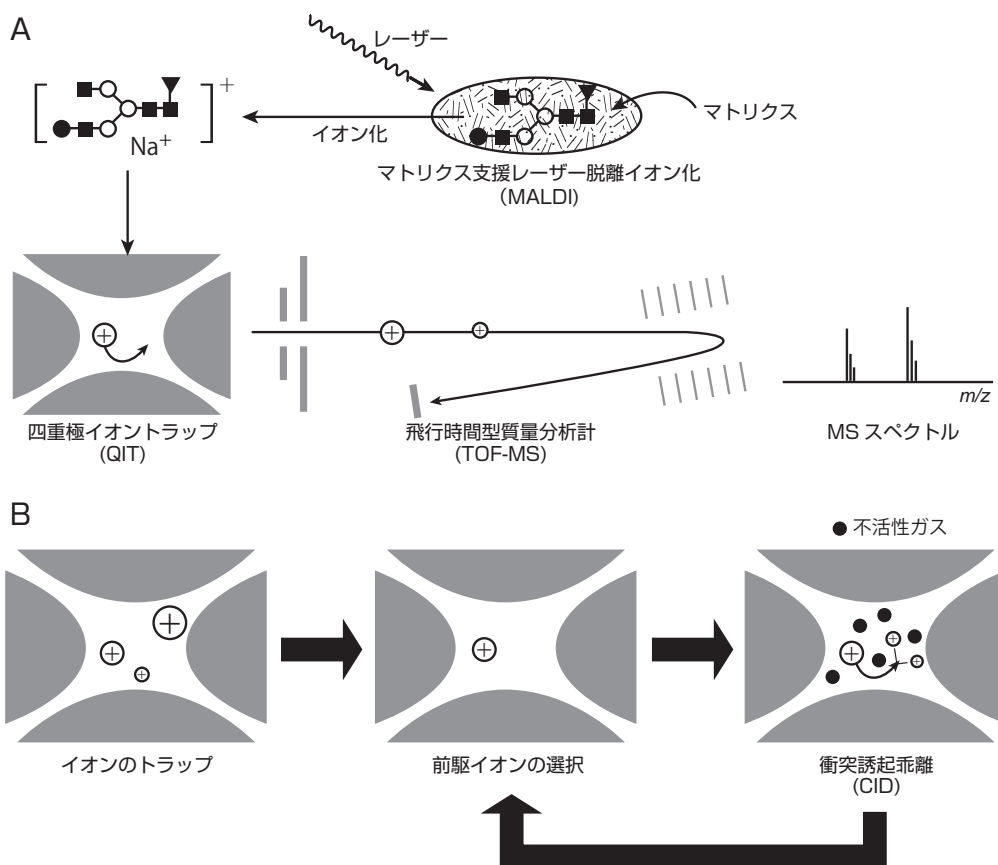


図2 MALDI-QIT-TOF MSの概略図

A: 糖鎖とマトリクスを混合した試料にレーザーを照射しイオン(図ではナトリウムイオン付加イオンを例示)を発生させる。イオンは四重極イオントラップに捕捉された後、飛行時間型質量分析計に送られ検出器に到着するまでの時間が測定される。この時間を質量電荷比(m/z)に変換したものがMSスペクトルとして表示される。

B: イオントラップは一定の範囲内にm/z値があるイオンをトラップする。これらのイオンをTOF-MSに送ればMSスペクトルが得られる。また、トラップされたイオンの中から特定のm/z値を持つイオン以外を排除することができる(前駆イオン^{用語4}の選択)。そのイオンと不活性ガスとを衝突させると小さなイオンに分解する(衝突誘起乖離)。分解したイオンをTOF-MSに送ることでMS²スペクトルが得られる。分解したイオンの中から再度前駆イオンの選択と衝突誘起乖離を行えば、MS²スペクトルが得られる。理論上は、同様の操作をn回繰り返すことによりMSⁿスペクトルが得られる。

異性体の判別が糖鎖解析の要であるという考えのもと、同一の分子量を有する複数の糖鎖の MSⁿ スペクトルを比較してみた。すると MS² では極めて類似したスペクトルを与えるものもあるが、MS³ まで比較すればほとんどの異性体が異なるスペクトルを与えることが分かった^[2]。一方、プロジェクトではその時すでにヒトの糖鎖遺伝子のほとんどをクローニングしており、各糖鎖遺伝子によってコードされる糖転移酵素^[15]のライブラリーを所有していた。糖転移酵素は特異性が極めて高いため、適切な酵素を選べば望む異性体を選択的に合成することが可能である^[14]。そこで、次のようなシナリオを考えた (図3)。

まず構造が明らかな糖鎖標品を多種類購入し、さらに糖転移酵素によって特異的に糖鎖を伸長させることにより糖鎖標品のバリエーションを増大させる。次に、各糖鎖標品の MSⁿ スペクトルを測定し、各糖鎖の固有値としてデータベース化する。そして、分析試料の MSⁿ スペクトルとデータベース内のスペクトルを比較することにより糖鎖構造を推定するアルゴリズムの開発を行う。さらに、構造推定アルゴリズムと質量分析計のオペレーションソフトを連携させるインターフェースソフトを開発する。最後にこれらすべてを統合し、安定性、再現性、簡便性に優れた糖鎖微量迅速解析システムとして製品化する。

4 要素技術開発

上に述べたシナリオを実現するため、産総研、三井情報(株)、そして(株)島津製作所の3者共同により糖鎖微量迅速解析システムの開発を行った。産総研は糖転移酵素ライブラリーのリソースを活用して糖鎖のスペクトルデータベースの構築を、糖鎖遺伝子サーチ等糖鎖関連のインフォマティクスに実績を有していた三井情報(株)は構造推定アルゴリズムを、質量分析計とのインターフェースソフトはMALDI-QIT-TOF MSのメーカーである(株)島津製作所が担当した。以下、それぞれの詳細について述べる。

4.1 糖鎖MSⁿスペクトルデータベース構築に向けて

4.1.1 糖鎖標識剤の選択

糖鎖分析では、一般的には蛍光標識された糖鎖あるいは完全メチル化された糖鎖が用いられ、誘導体化されていないそのままの糖鎖を分析することは少ない。したがって、データベースもそれに合わせて誘導体化された糖鎖標品を用いて作成しておく必要がある。その際、1種類の糖鎖について多種の誘導体を用意するのは現実的ではないため、どれかに絞らなければならない。糖鎖の蛍光標識剤は複数種あり、日本では2-Aminopyridine (PA)、欧米では2-Aminobenzamide (2-AB) が多用される^{[15][16]}。研究者によって蛍光標識剤の好みがあり、NEDOの糖鎖プロジェクト内部でもPyrene誘導体や3-Aminobenzoic acid (3-AA) など他の標識剤を推す声もあった。標識剤を選択するにあたって指標としたことは、MALDIにおけるイオン化効率、低エネルギーCID^[15]により得られるMSⁿ スペクトルの情報量、糖鎖研究現場での普及率の3点である。分かり易く言いかえれば、高感度に検出でき、わずかな構造上の違いがMSⁿ スペクトルに反映され、そして多くの人に使われていることに着目したことになる。種々、検討の結果、我々は国内で多用されていたPAが感度とMSⁿ における情報量においてバランスがよいと判断し、これをデータベース構築のための糖鎖標識剤として選定した。

4.1.2 データの再現性確保

データベースとして利用するためにはデータの再現性が必須である。しかし、低エネルギーCIDによるタンデム質量分析では、前駆イオンに与えるエネルギー(CIDエネルギー)の大きさに応じてスペクトルが変化する上に、厳密にそのエネルギーを制御することは不可能であるため、再現性のよいスペクトルを得るためには何らかの工夫が必要であった。我々は、前駆イオンがほぼ消失するCIDエネルギーでスペクトルを測定した場合、CIDエネルギーが前後に多少ぶれても毎回ほぼ同じMSⁿ スペクトルが得られるこ

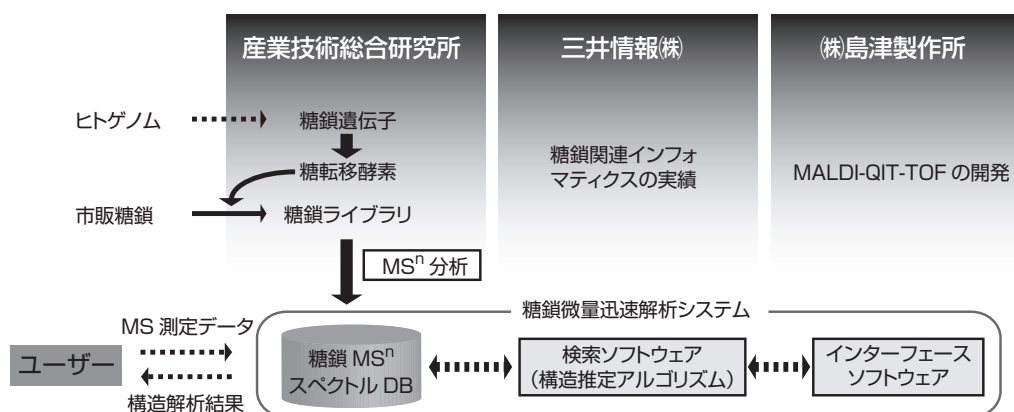


図3 各要素技術とそれらの背景および相互関係

とに着目した(図4)。そこで、種々検討の結果、前駆イオンの強度が最大ピークの15%以下となるCIDエネルギーでMSⁿスペクトルを測定するという基準を設けた^[17]。さらに1種類の前駆イオンについて、MS²スペクトルについては2件のスペクトルデータ、データがぶれやすいMS³以上の高次のスペクトルでは3件のスペクトルデータをデータベースに格納することで実測値のばらつきを吸収できるようにした。

4.1.3 測定モードおよび前駆イオン種の統一

質量分析計は分子をイオン化して、そのイオンを質量電荷比で分離、検出する装置である。正電荷を持つイオンを分析する測定モードを正イオンモードと呼び、負電荷を持つイオンを分析する測定モードを負イオンモードという。データベースを構築するに際し、どちらの測定モードを選択するかについても検討した。負イオンモードでは糖鎖構造推定に役立つ特殊なフラグメントを生じるケースが報告されており魅力を感じたが^{[18][19]}、イオン化の点で不利なことが分かり正イオンモードを選択した。また、イオン化においてもプロトン、ナトリウムイオン、カリウムイオン等が付加した種々のイオンが生成し、付加イオンの種類によってフラグメンテーションに違いがあるため、イオン種を決める必要がある。糖鎖の場合、ナトリウムイオン付加イオンを前駆イオンとする方が、プロトン付加イオンを前駆イオンとするよりも異性体間でスペクトルに差が出やすいことが分かり、前者を選択することとした。また、フコース含有糖鎖のプロトン付加イオンはイオントラップ内でフコースが転位するという報告もあり^[20]、その点からもナトリウムイオン付加イオンの

方が適していた。

4.1.4 マトリクス選択

MALDIではマトリクス選択も重要である。糖鎖は酸性条件下で分解しやすく、酸性のマトリクスを用いた場合にはイオン化の時点で分解物が生じるケースも少なくない。また、試料とマトリクスの共結晶を作製する際に生じる試料濃度のムラのため、レーザーを当てて目的のシグナルが得られる場所は限られるといういわゆるスイートスポットの問題もある。データベースではデータの再現性が求められるため、測定はオペレーター意思が入らない自動測定で行うことが望ましいが、スイートスポットがあるとそれが難しくなる。種々のマトリクスを検討したが、我々は2,5-ジヒドロキシ安息香酸(DHB)をマトリクスとして用い、一旦、共結晶を作製した後、エタノールで再結晶させることによりスイートスポットのない均一な微小結晶を作製する方法を採用した^[21]。DHBは酸性マトリクスでありイオン化時に糖鎖の分解を起こすケースもあったが、感度やスイートスポットの問題を考慮するとこの方法がベストであった。

4.1.5 データベース化するための糖鎖標品

市販で入手できるPA化糖鎖は種類が少ないので、糖鎖工学研究センターで保有していた糖転移酵素を用いて市販PA化糖鎖を修飾し、バリエーションを増大させた。糖鎖ライブラリーの合成では糖鎖工学研究センター伊藤浩美研究員(現公立大学法人福島県立医科大学)が中心的役割を担った。これらを試料として上述の測定を行い、最終的に2897スペクトルを糖鎖MSⁿスペクトルデータベースに組み込んでいる。

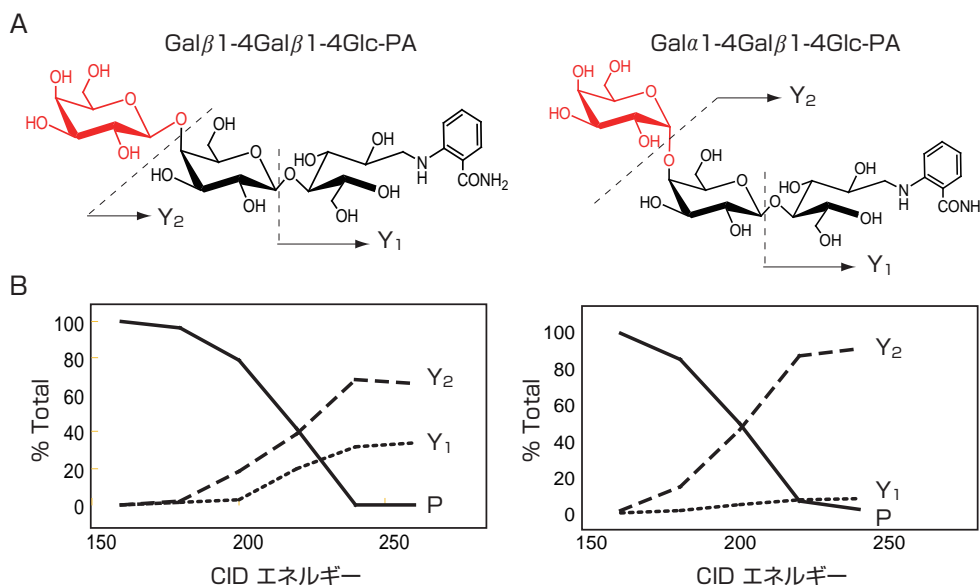


図4 イオントラップによる糖鎖のフラグメンテーション

左右の糖鎖は末端ガラクトース(赤部分)の立体配置のみ異なる異性体である。下段はCIDエネルギーを増大させていった時、それぞれの糖鎖から生じるフラグメントイオンのピーク強度の変化を表したものである。Pがほぼ消失するP<15%付近以上のCIDエネルギーではY₁/Y₂の比率がほぼ一定となる。また、一定となったY₁/Y₂比は二つの異性体間で異なっていることが判る。P: 前駆イオン、Y₁/Y₂: フラグメントイオン。

4.2 構造推定アルゴリズムと検索ソフトウェア

4.2.1 糖鎖記述法

データベースには糖鎖の構造情報と、その糖鎖の MSⁿ スペクトルデータが格納されている。糖鎖構造では分岐や結合様式を表現する必要があり、コンピューターで取り扱うことが難しいため、プロジェクト開始当初は標準化されたデータ記述法が存在していなかった。そこで XML^{用語7} による糖鎖記述法 CabosML (Carbohydrate sequence markup language) の開発を行った^[22]。CabosML 形式で記述された構造をデータベース化し、各種アプリケーションは CabosML 形式をインプットデータとして開発した。

4.2.2 ノイズピークの除去

検索ソフトウェアでは、測定された構造未知の MS スペクトルとデータベースに蓄積された構造既知のスペクトルを比較し、ピーク強度を含めたスペクトル形状の類似性をもとに構造推定を行う。参照用のスペクトルデータにノイズピークが含まれると、ノイズピークの影響で検索精度が低くなる。そこで糖鎖構造から理論上のフラグメントを計算し、各フラグメントのモノアイソトピック質量^{用語8}と一致するピークのみをスペクトルデータから抽出した。こうして得た強度情報を含むピークリストを検索用のスペクトルデータとした。

4.2.3 糖鎖ピークの検出

試料の MS スペクトルは、調べたい糖鎖のピーク以外にも夾雑物や分解物、マトリクス由来のピーク等種々のピークを含んでいる。したがって、データベース検索の最初のステップは、測定スペクトルから糖鎖のピークを検出することである。種々の方法があるが、データベースを用いた構造推定においては、データベースに登録されていない糖鎖ピークを解析する意味はないため、糖鎖ピークの検出は、それがデータベースに登録されているか否かを判断基準とした (図 5)。

後に述べるインターフェースソフトからはピークリストの他に標識剤やアダクト^{用語9}等の試料情報が送信される。検索ソフトウェアでは、それらの情報を考慮した上で、登録ピークと同じ m/z 値を持つ前駆イオンを検索し、見つかったピークを糖鎖由来のピークとしてインターフェースソフトに通知する。見つからない場合は、後述する Extended Search モードで糖鎖ピークを検出する (4.2.7 項参照)。

4.2.4 MS²検索

MS² 検索では、試料の MS² スペクトルとデータベース中の MS² スペクトルとの類似度を調べる。類似度は、各ピークの m/z 値とピーク強度からなるベクトルを用いて算出し、その値が閾値以上となった糖鎖を推定構造候補とする。

4.2.5 MS³検索と迅速同定

推定構造候補が複数存在する場合、MS³ の測定により

絞り込みを行う。MS³ では MS² スペクトル上の各ピークが前駆イオン候補となる (図 6)。MS² スペクトルの各ピークについて MS³ を測定し、その都度、データベース内のスペクトルと比較していたのでは手間も時間もかかってしまう。そこで、「どのピークの MS³ を測定すると一つに絞り込むことができるか」をあらかじめ DB 内の MS³ スペクトルを用いて予測し、それをインターフェースソフトに送信することで迅速同定を達成している。

4.2.6 Extended Searchモード

先に述べたように、我々はデータベース構築のために糖鎖の蛍光標識剤を PA に一本化した。したがってユーザーが異なる標識剤を用いている場合は、糖鎖構造推定ができない。このことは、他の標識剤を多用する欧米への普及を考えた場合に大きな弱点となる。そこでデータベースの中身を追加することなく、検索方法の工夫によってこの問題を解決した。それが Extended Search モードと名づけた検索方法である。Extended Search モードでは下記のような検索を実施する。

4.2.7 Extended Searchモードにおける糖鎖ピークの検出

ユーザーは分析している糖鎖の標識剤、アダクト等の試料情報を入力する。システムは、これらの情報を元に単糖の組み合わせにより理論上考えられるさまざまな糖鎖の m/z 値を計算し、その m/z 値の集合を作成する。測定された MS スペクトルの各ピークの m/z 値が、上記 m/z 値集合内に存在する場合、その m/z 値を糖鎖ピーク候補として提示する (図 5 右)。

4.2.8 キーフラグメントの提示

提示された糖鎖ピーク候補の MS² スペクトルは標識剤が異なるため、そのままではデータベース内のスペクトルとの類似度を判定できない。しかし、MS² スペクトル上に現れ

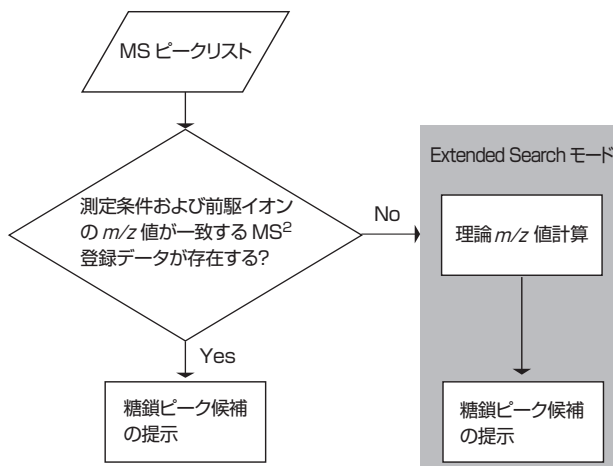


図5 糖鎖ピーク検出のロジックフロー

ているフラグメントの中には標識剤部分が外れたものも多く存在する。そして、これらを前駆イオンとしたMS³スペクトル同士を比較すれば構造推定できそうに思える。ここで注意すべきことは、MS²スペクトルの各ピークは単一のフラグメントからなるとは限らないという点である。ほとんどのピークは同一のm/z値を持つ複数のフラグメントの重ね合わせからなっている。そのようなピークを前駆イオンとしたMS³を比較しても構造推定には役立たない。構造推定するためには、標識剤を含まない単一のフラグメント構造からなるピーク(キーフラグメント)をMS³の前駆イオンとして選択しなくてはならない。N-結合型糖鎖では、還元末端のキトピオース部分が切断されやすく、この部分で切断されたフラグメントのm/z値は理論上、他のフラグメント構造を含み得ないためキーフラグメントとして利用できる(図7)。

そこで検索ソフトウェアでは糖鎖ピーク候補の前駆イオンのm/z値からキーフラグメントのm/z値、すなわち[m/z値 - (labeled GlcNAc)]もしくは[m/z値 - (Fuc labeled GlcNAc)]の値を計算し、ユーザーが測定したMS²データ内にそれが存在するかどうかを参照する。ただし、還元末端のGlcNAcにFucが結合した構造(図7A)からは[m/z値 - (labeled GlcNAc)]のピークは生じず、[m/z値 - (Fuc labeled GlcNAc)]のみを与える(図7B、キーフラグメントに対応)。これを考慮し、図8のようなロジックフローで検索を行う。

4.2.9 MS³検索

キーフラグメントのMS³測定データが検索システムに送られた場合は、データベース内のMS³データに対して検索を実行し類似度の高いものを探す。類似度が閾値を越える

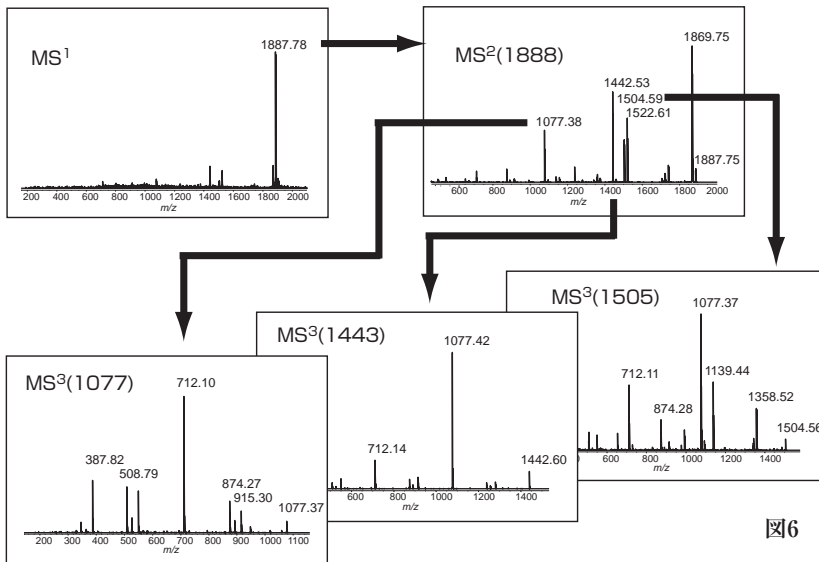


図6 多段階MSのツリー構造

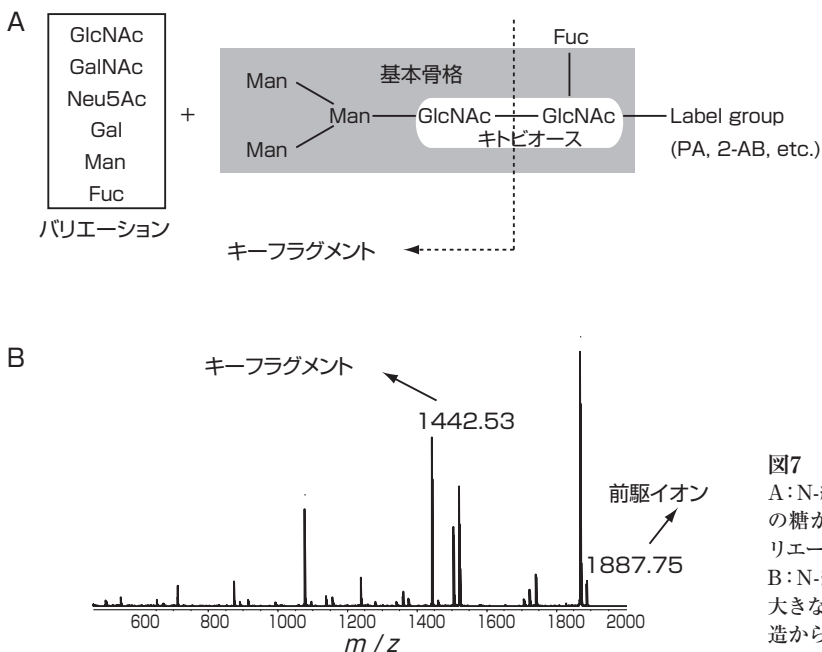


図7 N-結合型糖鎖の構造的特徴とキーフラグメント
A: N-結合型糖鎖は基本骨格の左端のManに白枠内の種々の糖がさまざまな結合様式で複数連結することによってバリエーションが生まれる。
B: N-結合型糖鎖のMS²スペクトルではキーフラグメントが大きなピークとなる。このピークは標識剤を含まない単一構造からなる。

糖鎖構造候補が複数存在した場合、それらの候補を絞り込むために利用できる MS⁴ データの前駆イオンの m/z 値をインターフェースソフトに送り、測定と検索を実行する。MS⁴ 候補がデータベース内に存在しない場合は検索を終了する。

4.3 インターフェースソフトウェア

糖鎖微量迅速解析システムは、検索ソフトウェアのナビゲーションを得ながら MS スペクトルを測定すれば、分析した試料の推定構造に誰でも簡単にたどりつけることを目的としている。これを実現するためには、質量分析計を制御・操作する分析ソフトウェアおよび検索ソフトウェア/データベースの他に、この両者と連携し“誰でも簡単に”使うこ

とができるようにするインターフェースソフトウェアが必要である。そこで、開発したインターフェースソフトウェアにはボタンクリック一つで、検索ソフトウェアからのデータを分析ソフトウェアへ渡す機能を実装し、また、分析ソフトウェアにもボタンクリックによりスペクトルデータをインターフェースソフトウェアへ渡すことができる機能を追加した。インターフェースソフトウェアを用いた分析フローの概要を図9に記す。

4.3.1 インターフェースソフトウェアを介した測定補助

測定された MS スペクトルデータは、分析ソフトウェアによって各ピークの m/z 値とピーク強度値で構成されるピークリスト形式に変換されてインターフェースソフトウェアに渡される。

インターフェースソフトウェアでは、検索用パラメータの入力を最初に行う。パラメータには分析した糖鎖の標識剤、アダクト等の試料情報、および検索ソフトウェアで使用するトレランス(許容誤差の設定値)等が含まれる。次いで分析ソフトウェアから受け取ったピークリストの情報に、ユーザーが設定したパラメータを付加して検索ソフトウェアに送信する。インターフェースソフトウェアは、次に測定すべき前駆イオンのリストを検索ソフトウェアから受信し、表示する。リストには優先順位がつけられており、ユーザーが選択した前駆イオンの情報が分析ソフトウェアに送られる。

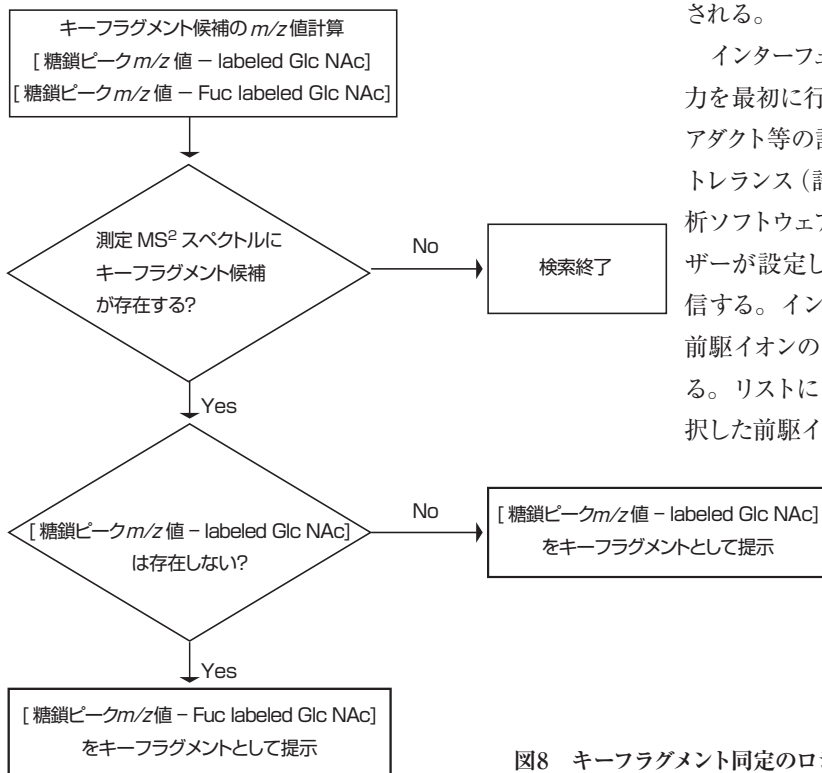


図8 キーフラグメント同定のロジックフロー

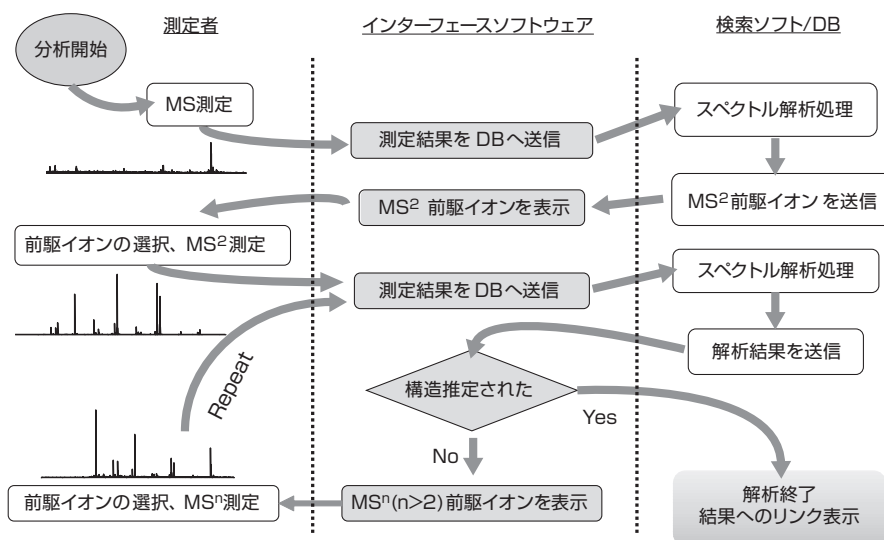


図9 糖鎖微量迅速解析システムの分析フロー
インターフェースソフトウェアは図の中央部分の機能を担い、測定者と検索ソフトの間を仲介する。

なお、測定候補の前駆イオン表示は、ユーザーが視覚的に理解し易い表示方法を採用した。具体的には、検索 ID ごとにツリー形式で測定候補をまとめることで、現在測定している MSⁿ の乗数や前段の前駆イオンの m/z 値等を容易に把握できる。また、各前駆イオンのアイコンは、スペクトルデータの取得状況等に応じて色を変えている (図 10)。

分析ソフトウェアでは、受け取った前駆イオン情報を MSⁿ 分析条件の設定欄に反映する。ユーザーは適切な CID エネルギー値を設定して MSⁿ 分析を実行する。得られた MSⁿ スペクトルデータを再びインターフェースソフトへ渡して検索を実行する。

4.3.2 結果の表示

インターフェースソフトウェアには、サーバーからのメッセージを表示する機能を実装した。検索ソフトウェアで構造推定結果が得られた場合、そのメッセージが表示されユーザーは分析終了を認識できる。また、構造推定結果は検索ソフトウェアで HTML 形式の Web ページに集約されており、閲覧はインターネットブラウザで行う。インターフェースソフトウェアには検索ソフトウェアから推定結果ページの Web アドレスが通知されており、ボタンクリックでインターネットブラウザが起動して構造推定結果の Web ページが表示される。推定結果には、グラフ形式でのスコア表示、推定糖鎖構造およびその糖鎖構造に関連する情報を日本糖鎖科学統合データベース (JCGGDB) で閲覧するためのリンクが表示されている (図 11)。

5 知財戦略

製品化するためには知財確保が必須である。このシステムの特許は「糖鎖構造同定方法及び同解析装置」という

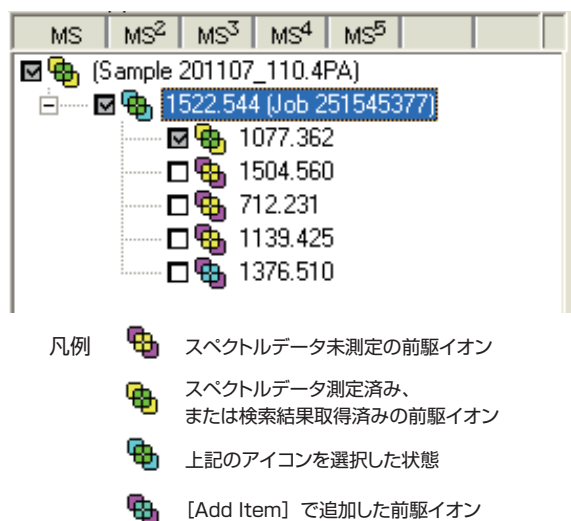


図10 測定候補前駆イオンのリスト表示

名称で出願した^[23]。方法とその方法を具現化したモノをクレームする特許である。分析対象物のスペクトルをデータベース内のスペクトルにマッチングさせて構造推定する方法は特に目新しい方法ではなく、対象を糖鎖に限ってもすでに先行特許が出願されていた。そこで弁理士と相談して、このシステムのコアとなるアイデアを前面に出すことにした。それは、「糖鎖構造解析の要は異性体判別にあり」という思想に基づくものであり、MS³ 以上の高次のタンデム MS スペクトルのマッチングにより構造推定する際に、異性体間で最もスペクトルに差が出るであろう MS³ スペクトルをデータベース内で検索し、その類似度が所定値以下の MS³ スペクトルのみを比較するという方法である。実際の請求項では、このアイデアを MS³ のみならず MSⁿ まで拡張している。研究者の感覚としては、これまでには存在しなかった糖鎖 MSⁿ データベースを活用した方法であるというだけで特許化できるように思いがちなので注意が必要であった。この特許は何度かのオフィスアクションを経て日本、ドイツ、中国で登録されている^{[24][25]}。

知財戦略としては、特許の他にも著作物として知財登録し権利を確保する方法がある。糖鎖微量迅速解析システムの構成は、質量分析計、糖鎖 MSⁿ スペクトルデータベース、構造推定アルゴリズム、インターフェースソフトである。この内、糖鎖 MSⁿ データベースは知的基盤の一つであり独立して利用する可能性もあるため産総研単独の著作物と

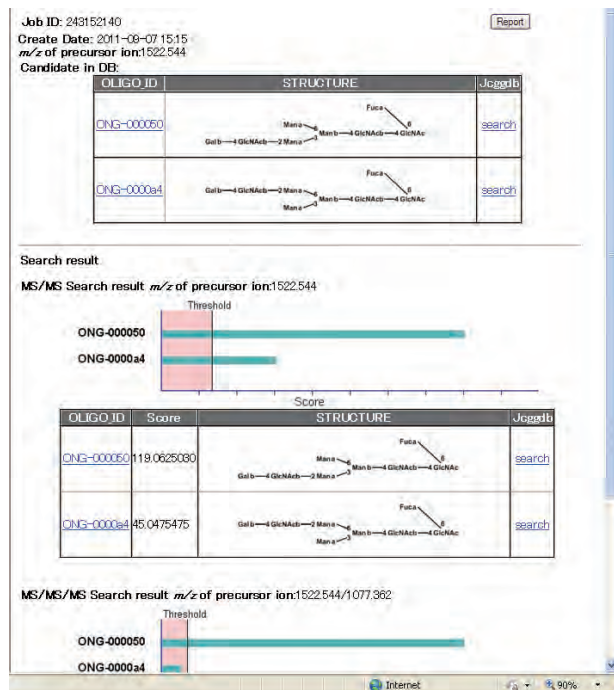


図11 検索結果の表示画面
スコアバーが閾値以内 (赤色部分) にある糖鎖がマッチした構造。Jcgddb欄のsearchをクリックすると、その糖鎖に関する情報のページが開く。

して作成し知財登録した^[26]。また、構造推定アルゴリズムを搭載した検索ソフトウェアは「CASIS」という名称で三井情報(株)と産総研の共同著作物として知財登録している^[27]。なお、質量分析計とインターフェースソフトは(株)島津製作所の特許および著作権でカバーされている。

なお、特許出願後の製品化に向けた本格研究は、当時の産総研知財部が担当していた特許実用化共同研究という枠組みで進めた。この枠組みがなければ製品化は実現していなかったかも知れない。

6 糖鎖微量迅速解析システムの製品化

本システムを普及するため、(株)島津製作所は3つの構成ユニット(データベース、検索ソフトウェア、インターフェースソフトウェア)をパッケージ化した製品の開発を進めた。本システムに格納されている糖鎖のMSⁿスペクトルデータベースは、ヒト細胞で生合成される糖鎖を対象として作られてきたことから、ヒトを研究対象とする分野にターゲットを絞り、特に当時、開発件数が増加傾向をたどっていた抗体医薬品をメインターゲットとして、産総研/三井情報(株)/(株)島津製作所3者での特許実用化共同研究を開始した。

糖鎖エンジニアリングプロジェクトでは、1台の質量分析計でデータ収集、検証等を実施していたため、製品化にあたっては質量分析計の機体間差を加味した上で正しい検索が行われることを確認する必要があった。そこで、プロジェクトで使用した質量分析計と同型の装置を複数台用意し、それぞれの装置で測定したデータを比較検証し、機体間でのデータの差が検索に大きな影響を与えないよう検索アルゴリズムの変更等を実施し、また装置状態を検査する方法も確定した。これらの作業と同時に、糖鎖MSⁿスペクトルデータベースの拡充も試みた。シアル酸含有N-結合型糖鎖を中心として、さらに多くの糖鎖MSⁿスペクトルをデータベースへ追加することが計画された。しかし、バイオ医薬の主要な生産宿主であるチャイニーズハムスター卵巣細胞(CHO)で得られる抗体医薬はシアル酸をほとんど含まないこと、またシアル酸含有糖鎖の測定はメチルエステル化という化学処理が別途必要となることから、これらのデータの収録は中止してソフトの完成に注力することを決めた。こうして、プロジェクト期間中に開発された機能を搭載した糖鎖微量迅速解析システム Accurate Glycan Analyzerの初期バージョンの市場投入を達成した(2010年6月)。

当時このシステムはPA標識されたN-結合型糖鎖および糖鎖の還元末端を糖アルコールに還元したO-結合型糖鎖の構造推定が可能なシステムで、さまざまな企業や研究者の注目度は高かったが、一方でPA標識以外の標識法

を採用している方々からは改良の要望が挙がっていた。そこで我々は、PA以外のさまざまな標識を施された糖鎖、たとえば2-AB化された糖鎖や2-aminobenzoic acid(2-AA)化された糖鎖等でも糖鎖構造推定を可能とする新たな機能(上述のExtended Searchモード)、さらにユーザー自身でデータベースを拡張できる機能やユーザー登録データを使用した検索を可能とするためのデータ検証機能を有した、よりユーザーの要求に答えられる改良版システムの開発を計画した。

上述の機能追加をすべて実施するための要求仕様を検討したところ、共同研究予算を大幅に上回る開発費用が必要となることが判明したため、コアとなる機能への絞り込みが必要となった。3者での議論を重ねた結果、各種ラベル化への対応を最優先すべきとの結論に至り、PA、2-AB、2-AAといった一般的な糖鎖標識だけでなく、ユーザー独自の標識剤を用いた場合にも既存データベースを利用して糖鎖構造推定ができるExtended Searchモードを有した改良版糖鎖微量迅速解析システムを開発することを決定した。こうして、各種糖鎖標識試薬への対応を実装した、改良版糖鎖微量迅速解析システム Accurate Glycan Analyzer 2を上市することができた(2011年12月)。

7 成果とその意義

7.1 トレンドに振り回されることなく貫く

糖鎖微量迅速解析システムは、2010年6月に初期バージョンを市場投入し、その後ユーザーからの要望に基づいた改良を加えて2011年12月に2ndバージョンを上市することができた。振り返ってみると、開発に着手した頃の競合相手はいずれも製品化には至っていない。世の中に出すためには世間のトレンドに振り回されることなく、製品化を目指して地道な作業を辛抱強く続けなければならない。このプロジェクトに関していえば、開発当初、質量分析計を用いた新しい糖鎖解析手法の開発はグライコミクスの中心的課題でもあり世界各地で活発な研究が進められたが、3年程度後にはトレンドが疾患バイオマーカーへシフトした。糖鎖解析手法の研究をしていた人たちの多くはさまざまな臨床試料の糖鎖分析を我先にと進め、次から次へとバイオマーカーの論文や特許出願を競い合った。解析手法の開発が未完成でも、それを投げ出して次のトレンドへシフトさせたのである。NEDOの糖鎖プロジェクトもバイオマーカー探索がテーマとなり、著者らもその波に吞まれ、NEDOプロジェクトにおけるシステム開発は断念せざるを得なかった。しかし、幸いにも糖鎖微量迅速解析システムの実用化研究は2007年から知財部の予算で別途進められることになり、最終的に上記の成果までこぎつけることができた。

現在では、6か国の10ヶ所の大学・企業・研究機関で利用されている(2015年4月現在)。また、実測MSⁿスペクトルデータベースは、それ自体をデータベースとして無償公開した。公開版は数値データではなくMSⁿスペクトルの画像のみとすることにより、学術的な有用性を保ちつつ、糖鎖微量迅速解析システムの出ないよう配慮した。

7.2 実験科学に裏付けられたソフトの力

我々が開発した製品は、実測MSⁿスペクトルデータベースを搭載した世界初の糖鎖解析システムである。誰でも簡単に糖鎖解析の要である異性体の判別をすることができる。現在のところ実測データベースを利用した糖鎖解析システムは我々の製品以外には上市されていない。このシステムは、新しいタイプの質量分析計というハードに、3つのソフト(スペクトルデータベース、構造推定アルゴリズム、インターフェースソフト)を組み合わせることで誕生した。ハードの能力を最大限に活かすためには、現場のニーズを捉えたソフトの力が必要である。カーナビシステムが見知らぬ場所でも目的地への行き方を案内するように、このシステムは糖鎖解析を知らないユーザーでもインタラクティブに推定構造へと導く。とはいえ、このシステムの開発は情報科学だけで成し遂げられたものでなく、糖鎖遺伝子や糖鎖分析等の実験科学が基礎になっていることを強調しておきたい。

なお、理論データベースを利用した糖鎖解析ソフトは市販されているが、無償のものも含めて現時点で世界標準になっているものは存在しない。

7.3 時代を先取りしすぎたか

糖鎖解析の要は異性体をいかに判別するかにある。我々はそのためにこのシステムを開発してきた。位置異性や立

体異性による糖鎖構造の違いは生体内で全く異なる機能を担うことは明白なのだが、それを調べようとするのは、今のところ従来から糖鎖を研究してきた糖鎖生物学研究者だけのようである。一般のライフサイエンス研究者にとっては糖鎖の分子量さえ判れば彼らにとって十分な進歩であり、そこに異性体の可能性が存在することは想像さえしないようである。この状況は糖鎖の機能解明がさらに進展することにより変化していくだろうと思われるが、現状、誰でも簡単に糖鎖を調べられるようにすることを目指して我々が開発した糖鎖微量迅速解析システムは、かなり時代を先取りしすぎた傾向がある。

8 アウトカムの実現に向けて

本当のアウトカムは、創薬や再生医療等ライフイノベーションの実現に第3の生命鎖「糖鎖」の知見が常態的に有効活用されている姿である。言い換えれば、糖鎖を調べておくことが当たり前になっている状態である。レクチンマイクロアレイや糖鎖微量迅速解析システムは、そのための布石の一部にすぎない。実のところ、糖鎖科学の技術基盤はまだ脆弱である。我々がデータベース化した糖鎖はヒトの糖鎖に限定したものである。粘膜や体液の粘性成分であるムチンは巨大な糖タンパク質で疾患との関連が示唆されているが、分析が難しいため機能の理解は進んでいない。最近、iPSマーカーとして報告されたポドカリキシンも実はムチン様タンパク質である^[28]。そのムチンの糖鎖であるO-結合型糖鎖の分析法は現在も研究が進められている。また、糖鎖分析のためには糖タンパク質を前処理して糖鎖を分析できる状態に誘導する必要があるが、この前処理プロセスも糖鎖研究普及の妨げになっており改善が必要である

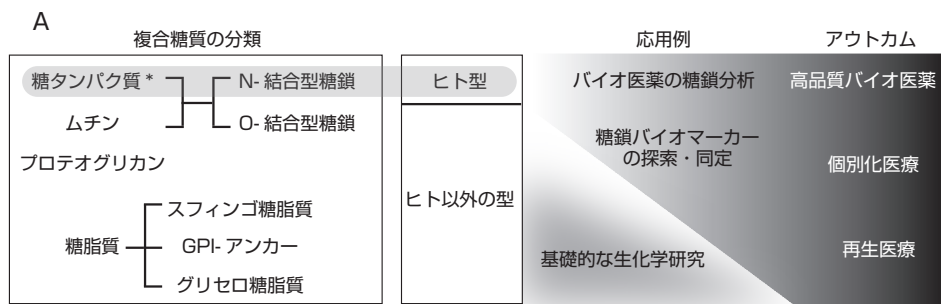
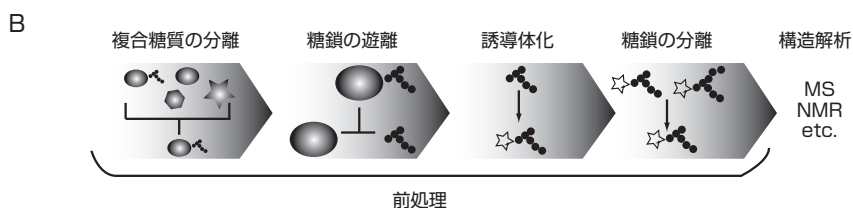


図12 複合糖質研究における本システムの位置付けと今後の課題
 A: 糖鎖はタンパク質や脂質に結合した複合糖質として存在する。種々の複合糖質があるが、本システムでは糖タンパク質のヒト型N-結合型糖鎖のみを対象にしている。*ムチンやプロテオグリカンも糖タンパク質であり、それらと区別するため、ここでは糖含量が50%以下の糖タンパク質を指している。
 B: 複合糖質の分析には多段階の前処理が必要である。本システムは最終段階の構造解析のみをサポートする。

このシステムの適用範囲



（図12）。これらの課題はほんの一例であり、「合成」や「機能」に関する課題を合わせれば、我々の前にはまだまだ大きな壁が立ちはだかっている。

アウトカムの実現には産業化が不可欠だが、糖鎖関連の研究については日本のお家芸と言われながらも、それを産業技術として社会に普及させた例は数少ないのが現状である。その意味で、数々の糖鎖リソース（知識、技術、そして人材）を蓄積してきた産総研は、今後、それらを深化、発展させるのみならず、企業と協力し産業技術として世に出していくことが重要になる。一方で、企業が製品として世に出す重要な要件として採算性がある。糖鎖関連の新技术を製品化しようとしたとき、最初に突き当たるのがこの問題である。市場を拡大するためには、製薬企業やライフサイエンス研究者に広く糖鎖の重要性が認識される必要がある。それには糖鎖機能解明の積み上げを継続し、インパクトのある実例を見出していかななくてはならない。凡庸な結論になるが、アウトカム実現には糖鎖に関する基礎研究から企業への橋渡しまでを含めた幅広い研究を今後も地道に進めていく必要があると考えている。

用語の説明

用語1: 高エネルギーCID:ここでは磁場セクター型質量分析計および飛行時間型質量分析計におけるCIDを指す。衝突により分子はさまざまな部位で切断されるが、複数箇所が同時に切断されることはないという特徴がある。

用語2: オミクス:ある生物に含まれる特定の生体分子種全体を網羅的に調べる研究手法。対象が遺伝子の場合はゲノミクス、タンパク質の場合はプロテオミクスという。2000年代初頭、質量分析計の急速な発展に伴ってメタボロミクスやグライコミクス等さまざまなオミクスが生まれた。

用語3: MSⁿ:多段階タンデム質量分析。イオントラップを用いたMSⁿについては図2Bを参照。

用語4: 前駆イオン:タンデム質量分析において、断片化するために選択されたイオン。

用語5: 糖転移酵素:糖を転移して糖鎖を伸長する酵素。結合位置や立体異性に関する特異性が極めて高い。そのため適切な糖転移酵素を選択することにより、精密な糖鎖の合成が可能となる。

用語6: 低エネルギーCID:ここでは四重極型質量分析計やイオントラップ型質量分析計におけるCIDを指す。分子内の弱い結合が切断される。糖鎖では複数箇所が切断されたフラグメントもしばしば観測される。電荷を有する糖鎖標識剤を用いるとイオン化効率は上がるが、標識剤を含むフラグメントのみが観測されることになり情報量が低下する。電荷を持たない標識剤でも標識剤を含むフラグメントと含まないフラグメントで観測される強度

の差が大きい場合は同様にスペクトルの情報量が低下する。

用語7: XML:Extensible Markup Languageの略称。文章の論理的な構造や意味をタグと呼ばれるマークアップで指定し、文章を構造化して記述するためのコンピューター言語の一種。文章を構造化して記述することによりデータの共有やプログラムによる処理を容易にすることができる。

用語8: モノアイソトピック質量:元素には種々の天然同位体がある。分子の各構成元素について最大存在比同位体の質量のみを用いて計算された質量をモノアイソトピック質量という。

用語9: アダクト:付加体。ここでは、質量分析における糖鎖のイオン化の際に生じるイオン付加イオンを指す。プロトン付加イオン、ナトリウムイオン付加イオン等がある。

参考文献

- [1] 木幡陽: 糖鎖工学 (糖鎖工学研究協議会 監修), 3-3, 株式会社産業調査会, 東京 (1992).
- [2] 成松久: 糖鎖研究のための基盤ツール開発およびその応用と実用化—過去10年間の産総研糖鎖医工学研究センターの研究戦略, *Synthesiology*, 5 (3), 190-203 (2012).
- [3] 平林淳: 糖鎖プロファイリング技術がもたらすパラダイムシフト—フロンタル・アフィニティ・クロマトグラフィーからエバネッセント波励起蛍光検出法へ, *Synthesiology*, 7 (2), 105-117 (2014).
- [4] A. Kuno, N. Uchiyama, S. Koseki-Kuno, Y. Ebe, S. Takashima, M. Yamada and J. Hirabayashi: Evanescent-field fluorescence-assisted lectin microarray: a new strategy for glycan profiling, *Nat. Methods*, 2 (11), 851-856 (2005).
- [5] A. Kuno, Y. Ikehara, Y. Tanaka, K. Saito, K. Ito, C. Tsuruno, S. Nagai, Y. Takahama, M. Mizokami, J. Hirabayashi and H. Narimatsu: LecT-Hepa: A triplex lectin-antibody sandwich immunoassay for estimating the progression dynamics of liver fibrosis assisted by a bedside clinical chemistry analyzer and an automated pretreatment machine, *Clin. Chim. Acta*, 412 (19-20), 1767-1772 (2011).
- [6] A. Matsuda, A. Kuno, H. Matsuzaki, T. Kawamoto, T. Shikanai, Y. Nakanuma, M. Yamamoto, N. Ohkohchi, Y. Ikehara, J. Shoda, J. Hirabayashi and H. Narimatsu: Glycoproteomics-based cancer marker discovery adopting dual enrichment with *Wisteria floribunda* agglutinin for high specific glyco-diagnosis of cholangiocarcinoma, *J. Proteomics*, 85, 1-11 (2013).
- [7] H. Tateno, M. Toyoda, S. Saito, Y. Onuma, Y. Ito, K. Hiemori, M. Fukumura, A. Matsushima, M. Nakanishi, K. Ohnuma, H. Akutsu, A. Umezawa, K. Horimoto, J. Hirabayashi and M. Asashima: Glycome diagnosis of human induced pluripotent stem cells using lectin microarray, *J. Biol. Chem.*, 286 (23), 20345-20353 (2011).
- [8] D. Ashline, S. Singh, A. Hanneman and V. N. Reinhold: Congruent strategies for carbohydrate sequencing. 1. Mining structural details by MSⁿ, *Anal. Chem.*, 77 (19), 6250-6262 (2005).
- [9] H. Zhang, S. Singh and V. N. Reinhold: Congruent strategies for carbohydrate sequencing. 2. FragLib: an MSⁿ spectral library, *Anal. Chem.*, 77 (19), 6263-6270 (2005).
- [10] A. J. Lapadula, P. J. Hatcher, A. J. Hanneman, D. J. Ashline, H. Zhang and V. N. Reinhold: Congruent strategies for

- carbohydrate sequencing. 3. OSCAR: an algorithm for assigning oligosaccharide topology from MSⁿ data, *Anal. Chem.*, 77 (19), 6271-6279 (2005).
- [11] K. Fukui, A. Kameyama, Y. Mukai, K. Takahashi, N. Ikeda, Y. Akiyama and H. Narimatsu: A computational study of structure-reactivity relationships in Na-adduct oligosaccharides in collision-induced dissociation reactions, *Carbohydr. Res.*, 341 (5), 624-633 (2006).
- [12] A. Kameyama, S. Nakaya, H. Ito, N. Kikuchi, T. Angata, M. Nakamura, H. K. Ishida and H. Narimatsu: Strategy for simulation of CID spectra of N-linked oligosaccharides toward glycomics, *J. Proteome Res.*, 5 (4), 808-814 (2006).
- [13] H. Suzuki, A. Kameyama, K. Tachibana, H. Narimatsu and K. Fukui: Computationally and experimentally derived general rules for fragmentation of various glycosyl bonds in sodium adduct oligosaccharides, *Anal. Chem.*, 81 (3), 1108-1120 (2009).
- [14] H. Ito, A. Kameyama, T. Sato, K. Kiyohara, Y. Nakahara and H. Narimatsu: Molecular-weight-tagged glycopeptide library: efficient construction and applications, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.*, 44 (29), 4547-4549 (2005).
- [15] S. Hase: Pyridylamination as a means of analyzing complex sugar chains, *Proc. Jpn. Acad. Ser. B Phys. Biol. Sci.*, 86 (4), 378-390 (2010).
- [16] P. J. Domann, A. C. Pardos-Pardos, D. L. Fernandes, D. I. Spencer, C. M. Radcliffe, L. Royle, R. A. Dwek and P. M. Rudd: Separation-based glycoprofiling approaches using fluorescent labels, *Proteomics*, 7 (Suppl 1), 70-76 (2007).
- [17] A. Kameyama, N. Kikuchi, S. Nakaya, H. Ito, T. Sato, T. Shikanai, Y. Takahashi, K. Takahashi and H. Narimatsu: A strategy for identification of oligosaccharide structures using observational multistage mass spectral library, *Anal. Chem.*, 77 (15), 4719-4725 (2005).
- [18] D. J. Harvey: Collision-induced fragmentation of negative ions from N-linked glycans derivatized with 2-aminobenzoic acid, *J. Mass Spectrom.*, 40 (5), 642-653 (2005).
- [19] D. J. Harvey: Fragmentation of negative ions from carbohydrates: part 1. Use of nitrate and other anionic adducts for the production of negative ion electrospray spectra from N-linked carbohydrates, *J. Am. Soc. Mass Spectrom.*, 16 (5), 622-630 (2005).
- [20] M. Wuhrer, C. A. Koeleman, C. H. Hokke and A. M. Deelder: Mass spectrometry of proton adducts of fucosylated N-glycans: fucose transfer between antennae gives rise to misleading fragments, *Rapid Commun. Mass Spectrom.*, 20 (11), 1747-1754 (2006).
- [21] D. J. Harvey: Quantitative aspects of the matrix-assisted laser desorption mass spectrometry of complex oligosaccharides, *Rapid Commun. Mass Spectrom.*, 7 (7), 614-619 (1993).
- [22] N. Kikuchi, A. Kameyama, S. Nakaya, H. Ito, T. Sato, T. Shikanai, Y. Takahashi and H. Narimatsu: The carbohydrate sequence markup language (CabosML): an XML description of carbohydrate structures, *Bioinformatics*, 21 (8), 1717-1718 (2005).
- [23] 亀山昭彦, 成松久, 菊池紀広, 中家修一: 特許第4025850号「糖鎖構造同定方法及び同解析装置」, 平成16年3月19日出願, 平成19年10月19日登録.
- [24] 亀山昭彦, 成松久, 菊池紀広, 中家修一: ドイツ特許第112005000598.4号「糖鎖構造同定方法及び同解析装置」, 平成17年3月18日出願, 平成21年2月5日登録.
- [25] 亀山昭彦, 成松久, 菊池紀広, 中家修一: 中国特許第ZL200580008027.4号「糖鎖構造同定方法及び同解析装置」, 平成17年3月18日出願, 平成21年6月3日登録.
- [26] 亀山昭彦, 伊藤浩美, 佐藤隆, 成松久: データベースH23PRO-1310「糖鎖多段階タンデム質量分析スペクトルデータベースver-2」, 平成23年9月12日登録.
- [27] 亀山昭彦, 菊池紀広: プログラムH23PRO-1311「CASIS-ver2」, 平成23年9月14日登録.
- [28] H. Tateno, A. Matsushima, K. Hiemori, Y. Onuma, Y. Ito, K. Hasehira, K. Nishimura, M. Ohtaka, S. Takayasu, M. Nakanishi, Y. Ikehara, M. Nakanishi, K. Ohnuma, T. Chan, M. Toyoda, H. Akutsu, A. Umezawa, M. Asashima and J. Hirabayashi: Podocalyxin is a glycoprotein ligand of the human pluripotent stem cell-specific probe rBC2LCN, *Stem Cells Transl. Med.*, 2 (4), 265-273 (2013).

執筆者略歴

亀山 昭彦 (かめやま あきひこ)

1994年岐阜大学連合大学院連合農学研究科博士課程修了(農学博士)。日清製油(株)医薬品部、アルバータ大学理学部博士研究員、アマシヤムファルマシアバイオテック(株)シニアサイエンティストを経て、2005年産総研主任研究員、2006年産総研糖鎖医工学研究センター研究チーム長、2012年産総研生物プロセス研究部門研究グループ長、2015年4月産総研創薬基盤研究部門上級主任研究員、現在に至る。岐阜大学連合大学院連合農学研究科客員教授(2013年～)。大学時代より一貫して糖鎖研究に取り組んできた。この論文では、1章～3章、4.1章、5章、7章、8章の執筆および全体の編集を担当した。



菊池 紀広 (きくち のりひろ)

1999年東京理科大学理工学研究科応用生物科学専攻修士課程修了。2006年博士(医学)取得(筑波大学)。三井情報(株)事業開発部パーソナルゲノム室室長(～2014年8月)。2014年9月よりバイエル薬品株式会社オープンイノベーションセンターマネージャー。この論文では4.2章の執筆を担当した。



中家 修一 (なかや しゅういち)

2002年東京大学大学院新領域創成科学研究科修士課程修了。(株)島津製作所分析計測事業部グローバルアプリケーション開発センター主任。この論文では、6章の執筆を担当した。



船津 慎治 (ふなつ しんじ)

2001年福井県立大学生物資源学部卒業。(株)島津製作所分析計測事業部ライフサイエンス事業統括部MSビジネスユニット主任。この論文では、4.3章の執筆を担当した。



査読者との議論

議論1 全般

コメント（久保 泰：産業技術総合研究所）

タンパク質や核酸と比べて、糖鎖はその構造と機能の多様性・複雑性故に本態解明と利用技術は大幅に遅れていたが、国の積極的なサポートのもとで日本の糖鎖研究及び医療、創薬を始めとするバイオテクノロジー技術は大きく進展し、今や世界をリードしているといえる。その中で産総研研究者の果たした役割は大きい。著者らは、糖鎖エンジニアリングプロジェクトにおいて糖鎖構造解析を担当してきた。この論文では、糖鎖構造を質量分析する際に遭遇する問題点を著者らがいかに解決して構造を解析しさらにはそれを利用する技術を確立したか、またさらにはこれらの要素技術を統合して糖鎖解析システムを作り上げ、知財確保を意識しながらそれを汎用性ある製品にするまでの過程が述べられている。シンセシオロジー誌の趣旨に沿った論文と言えます。

コメント（田尾 博明：産業技術総合研究所）

この論文は、今後の糖鎖研究、糖鎖工学に不可欠な「異性体や分枝構造を解析できる糖鎖分析システム」の製品化の背景、要素技術、開発シナリオ、現時点での製品としての能力、アウトカム実現に向けての将来展望を記したものです。産総研、分析装置製造会社、情報処理会社の3者の得意技術とその融合戦略が適切に記述されており、新たな学術分野を開拓するうえで、まず必要となる分析装置、分析システムの開発を目指す研究者や技術者にとって有用な情報が含まれていることから、シンセシオロジーに掲載する価値は十分あると考えます。

議論2 研究シナリオ

コメント（久保 泰）

3章のシナリオは、シンセシオロジー誌にとって重要なポイントとなります。4章で述べられている個々の要素技術開発も含めて、研究開発から製品化に至る流れを一つの図として作っていただきたい。

コメント（田尾 博明）

3章のシナリオは、「3糖鎖微量迅速解析システム開発のシナリオ」として、記述したほうがよいと考えます。なお、ここで開発前に各社が有していた技術、例えば、産総研であれば、ヒトの糖鎖遺伝子のクローニング、糖転移酵素ライブラリー、島津であればMALDI-MS等の技術と、本システムのために新たに開発することになった技術を図示して頂ければ、全体の戦略が理解しやすくなると考えられます。

回答（亀山 昭彦）

「図3 各要素技術とそれらの背景および相互関係」を3章に追加しました。

議論3 要素技術

コメント（久保 泰）

4章は、糖鎖構造解析の汎用システムを作り上げるために直面した種々の問題の解決策、工夫が書かれてあり、力の入っているところですが、専門外の読者にとっては専門用語が多用されているために理解が追いつかない箇所が多いのが問題です。全体的にそれを念頭に記述の見直しをお願いします。用語の説明を最後につけることも読者の助けになります。質量分析法の概略図を最初に見せるという工夫もあるのではないのでしょうか。

回答（亀山 昭彦）

この研究で使用した質量分析計の概略図を説明文とともに2章に追加しました。また、末尾に用語解説を載せました。

議論4 検索ソフトウェア・分析ソフトウェア

質問・コメント（久保 泰）

糖鎖MSスペクトルデータの再現性ある取り方や利用可能なデータベースとするための構造記述法やピーク抽出法等については、手探り状態からの解決努力が欧米との技術比較も交えて述べられています。検索・分析ソフトウェアについては、世界標準はどうでしょうか。またJCGGDB以外のデータベースとの互換性は図られているのでしょうか。その辺り、他の競合との比較/互換についても言及していただきたい。

回答（中家 修一）

糖鎖検索ソフト・分析ソフトの世界標準は存在していないと思われます。よく使われている検索ソフトとしては、ExPASy protein serverに登録されているGlycoMod Toolが挙げられます。Web上のツールですが、無料使用できます。しかし、これは構造解析に利用するものではなく、MSスペクトル中の糖鎖ピークを検出するとともに分子量から推定される糖鎖組成を表示するのみです。また、最近、普及しつつあるものとしてSimGlycan (Premier Biosoft社) という有料ソフトウェアがありますが、実測スペクトルのデータベースではなく、計算したフラグメントのデータベースを利用したものです。これら以外で質量分析を利用したものとしては各MSメーカーが独自に開発・販売している状態です。また、インターフェースソフトを介しての検索については現状、JCGGDBのデータベース以外に互換性はありません。

回答（亀山 昭彦）

糖鎖構造解析の要は異性体の判別であると考えています。そうすると、計算したフラグメントのデータベースでは役に立ちません。この旨は2.1に記載済みです。

議論5 成果とその意義

コメント（田尾 博明）

7.3「時代を先取りしすぎたか」では、本当に記述したいこと、あるいはすべきことは、「最先端を切り開く者の困難と、それでも、糖鎖研究に貢献する信念」のように感じました。そのためには、本システム導入の効果、有効な応用例を紹介することができればよいと考えます。

回答（中家 修一）

本システムは、海外の医薬品開発支援企業にてバイオシミラー開発における糖鎖構造差異解析に本システムを利用すべく導入されています。

回答（亀山 昭彦）

導入の効果や有効な応用例はこれから出てくると信じています。

議論6 アウトカムの現実に向けて

コメント（田尾 博明）

8章で本システムの応用可能な研究対象等が記述されていますが、これらを体系的に図示できると、糖鎖研究の全体像を把握でき、読者に分かり易くなると考えます。そのためには、例えば、糖鎖の種類を示す糖鎖の全体像、その中で、本システムが適用できる糖鎖、適用できない糖鎖に対する、今後の研究開発の方向性等が示されればよいと考えます。

回答（亀山 昭彦）

8章に図12「複合糖質研究における本システムの位置付けと今後の課題」を追加しました。