

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

— フロントアフィニティ・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 —

平林 淳

糖鎖は、遺伝子、タンパク質に次ぐ第3の生命鎖と言われるが、複雑な構造等が障害となり機能の解明は大幅に遅れている。近年、グライコミクスと呼ばれる糖鎖の総合解析が、プロテオミクスの隆盛に後押しされるかたちで進行し出した。その中で、糖鎖プロファイリングと呼ばれる簡易解析法が注目を浴びている。レクチンマイクロアレイは、特異性の異なる数十種の糖結合タンパク質（レクチン）をスライドガラス上にプリントし、蛍光標識された糖タンパク質や細胞抽出液を反応させるという新たな解析手法である。従来法と異なり、糖鎖の遊離と相互分離を必要としない点が利点であり、これにより、細胞の起源や状態を反映した糖鎖プロファイルが迅速、簡便に得られるようになった。レクチンマイクロアレイは、今や、腫瘍マーカー探索、幹細胞品質管理、バイオ医薬品開発等、さまざまなバイオ分野で利用される先鋭技術である。しかし、その実現には先行技術であるフロントアフィニティ・クロマトグラフィーの高性能化とそれを用いた原理検証が必要であった。開発からの10年を振り返る。

キーワード: 糖鎖プロファイリング、フロントアフィニティ・クロマトグラフィー、レクチンマイクロアレイ、エバネッセント波、GLIT (Glyco-innovation and Industrial Technology)

Development of lectin microarray, an advanced system for glycan profiling

– From frontal affinity chromatography to evanescent wave excitation fluorescence detection method –

Jun HIRABAYASHI

Glycans are called third class repeating biopolymers, after nucleic acids (first class) and proteins (second class). Elucidation of glycan functions has long been hampered by the difficulty in analyzing their structure. Recent progress in proteomics technology has accelerated progress in glycomics, which is the systematic study of glycans. Glycan profiling has increasingly attracted attention as a method that enables rapid analysis of complex features of glycans. Lectin microarray provides a novel platform and a simplified experimental procedure, which does not require glycan liberation and separation prior to the analysis. It is now being applied to tumor marker investigation, stem cell qualification, and biologics development. The author reviews the last 10 years of lectin microarray development, a period that began as a national project in which he has been actively involved.

Keywords: Glycan profiling, frontal affinity chromatography, lectin microarray, evanescent wave, GLIT (Glyco-innovation and Industrial Technology)

1 はじめに

1) なぜ糖鎖解析が困難か

糖鎖は複雑な構造と多様な存在形態をもつ生体情報分子である。核酸やタンパク質とは異なり、さまざまな結合様式と分岐構造をもつことや遺伝情報から糖鎖構造を予測できないことが糖鎖の解析と理解をたいへん困難なものにしている。糖鎖の構造的特徴の一つに多くの異性体の存在が挙げられる。これら異性体は互いに類似した性質をもつため、それぞれを完全に分離することが難しい。一方、糖鎖はミルクや尿中に遊離形で存在する場合もあるが、多くはタンパク質や脂質に結合したかたちで存在し、細胞上に提示されるか血液等の体液中に分泌される。糖タンパク

質では、その生合成過程でおびただしい種類の糖鎖修飾を受けることが知られている。図1に典型的な糖タンパク質のモデル構造を示す。糖鎖構造には単糖組成など基本的な共通性があるが、このことは糖鎖に対する抗体の調製を難しくし、糖鎖の組織分布や特異検出を困難にする。一方、糖鎖構造は生物ごとに少しずつ異なることが多い。近年では、動物細胞を用いてバイオ医薬品となるホルモンや抗体を生産させることが主流だが、多くのバイオ医薬品は糖タンパク質である。このため、タンパク質のアミノ酸配列はヒトと完全に同一でも、糖鎖構造は生産宿主に依存した異種型となってしまう。糖鎖構造を完全にヒト型にする技術は完成しておらず、CHO (Chinese hamster ovary) 細

産業技術総合研究所 幹細胞工学研究センター 〒305-8568 つくば市梅園 1-1-1 中央第2

Research Center for Stem Cell Engineering, AIST Tsukuba Central 2, 1-1-1 Umezono, Tsukuba 305-8568, Japan E-mail: jun-hirabayashi@aist.go.jp

Original manuscript received August 2, 2013, Revisions received October 14, 2013, Accepted October 15, 2013

胞等、動物細胞で調製したバイオ医薬品がアレルギーや急性拒絶反応を引き起こす危険性が指摘されている。

解析が極めて難しい糖鎖だが、幸いなことに我が国ではかねてより糖鎖研究が盛んであり、糖鎖の解析に不可欠なグリコシダーゼや解析技術の多くが我が国から生み出された^{注1)}。一方、21世紀初頭、糖鎖の構造解析は「質量分析法」が主軸になると考えられていた。しかし、質量分析法は、詳細な構造解析に威力を発揮する半面、生体試料の取り扱いが難しいという難点があった。その点、この論文のテーマである糖鎖プロファイリング技術は、質量分析法の難点のいくつかをクリアできる可能性があった。糖鎖プロファイリングとは、一言で言えば、糖鎖の構造的特徴を迅速簡便に取得することで、厳密な構造同定に至らずとも、主だった特徴（糖鎖の種類やエピトープ^{注2)}の存在、分岐度、修飾の度合いなど）、比較するサンプル間での差異、類似度等を明らかにすることである。

2) 2002年（糖鎖エンジニアリングプロジェクト発進前年）を振り返って

話が前後するが、著者は2003年に実質スタートする（独）新エネルギー・産業技術総合開発機構（NEDO）の糖鎖構造解析技術開発プロジェクト参画メンバーとして、2002年11月に（独）産業技術総合研究所（産総研）に入所した。プロジェクトリーダー予定者であった成松久 糖鎖工学研究センター・副センター長（当時）の招きで、21年勤務した私立大学を辞してのことだった。いわゆる糖鎖エンジニアリングプロジェクト（SG：Structural Glycomics と

略された）の始動である。成松副センター長はこれより数年前に大学から産総研に移り、経済産業省傘下の「糖鎖遺伝子ライブラリー開発プロジェクト」（GG：GlycoGene、2001年度～2003年度）を主導し、我が国の糖鎖遺伝子ライブラリー開発に貢献した^{注2)}。この成功を受け、糖鎖構造の解析技術の開発は最重要課題とされた。田中耕一氏によるマトリックス支援レーザー脱離イオン化法質量分析装置、とりわけAXIMA-QIT-MALDI装置が、複雑な糖鎖構造に対する解析の有効法として期待された。

実際のSGプロジェクトは、構造解析技術開発と合成技術開発の2部構成で進行した。著者が直接かかわった構造解析技術開発テーマの体制と研究テーマの詳細を表1に示す。

3) 目的とニーズ

糖鎖はタンパク質のなかの不均一な構造の混合物として存在するため、これらの化学構造を存在量とともに正確に決めることはほとんど不可能である。しかし、糖鎖の微細な構造差や量比の違いを迅速簡便に検出することができるなら、本手法で抽出された情報は、その後の詳細な構造解析やバイオマーカー探索に大いに役立つ。微生物の細胞表面糖鎖の比較など^{注3)注4)}、今まで解析例がなく、糖鎖プロファイリングだけで、十分意味のある結果が得られる場合もある。しかし、この技術はバイオマーカー開発などにおける解析戦略の導入部分で用いることを主眼としている。質量分析やLCマッピング法等の解析法との大きな違いは、糖鎖をタンパク質から切り出すことなく、そのままの状

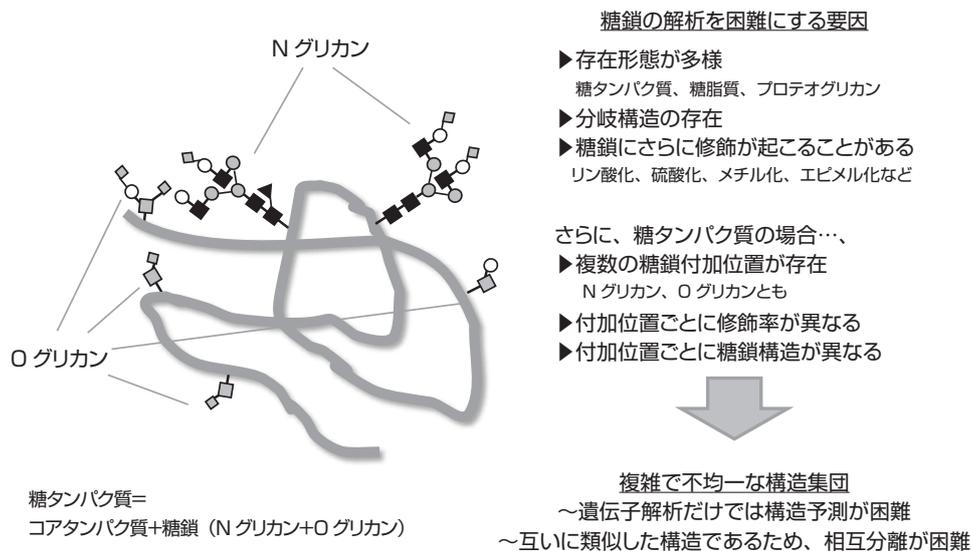


図1 糖タンパク質の模式図と糖鎖解析が困難である要因

コアタンパク質を形成するペプチド鎖部分を太いヒモ状の線で示す。分泌タンパク質と膜結合タンパク質のほとんどは翻訳中、および翻訳後過程で糖鎖修飾が施される。糖鎖付加位置は一家所の場合もあるし複数の場合もある。糖鎖の種類には大きく分けて、アスパラギン残基の側鎖（-NH₂）に付加する場合（Nグリカン）とセリン・トレオニン残基側鎖（-OH）に付加する場合（Oグリカン）がある。それぞれの付加位置における糖鎖修飾率は100%とは限らず、構造のバリエーションも10種以上共存するのが一般である。これらの要素を合わせると、糖タンパク質が有する構造的多様性は膨大となる。細胞の種類が変わると糖鎖構造も変化する。種々の糖鎖バイオマーカーはこの性質を利用したものに他ならない。糖鎖が「細胞の顔」と言われるゆえんである。

表1 SGプロジェクト（2002補正～2005年度）糖タンパク質構造解析技術開発のテーマと実施体制

| |
|---|
| 1. 糖タンパク質構造解析技術の開発 |
| 1-1. グライコプロテオミクス（産総研、首都大、近畿大、島津製作所、ジールサイエンス、他） |
| ・プロテオーム型戦略（プロテオーム解析手法による大規模糖タンパク質の同定） |
| ・グライコーム型戦略（タンパク質同定と糖鎖構造情報の双方を取得する方法論の開発） |
| ・グライコフォーム解析（糖タンパク質から糖鎖を切り離し糖鎖する手法の解析） |
| 1-2. 質量分析利用糖鎖構造解析（産総研、島津製作所、サイバーレーザ、三井情報、東京理科大、他） |
| ・MALDI-QIT-TOF 質量分析計による糖鎖構造解析、糖ペプチドに適した高スループット・ソフトイオン化方法の探索、糖ペプチドの構造解析に適した断片化法の探索 |
| 1-3. 糖鎖プロファイリング技術（産総研、島津製作所、J-オイルミルズ、東大、他） |
| ・FAC：レクチン・標準糖鎖間の網羅的相互作用解析 |
| ・糖鎖プロファイラー開発：エバネッセント波動起法に基づくレクチンマイクロアレイの開発 |
| 2. 糖鎖構造同定データベースの構築（産総研、三井情報、富士通） |
| ・糖タンパク質データベースの構築 |
| ・オリゴ糖データベースの構築 |
| ・レクチンプロファイルの解析 |
| ・質量分析による糖鎖構造解析ソフトウェアの開発 |
| ・分子計算に基づく糖鎖断片化予測ソフトウェアの開発 |

態で蛍光標識し、解析する点である。LC マッピング法^[5]は我が国で開発された糖鎖構造の照合式同定法^[3]だが、この方法は、糖鎖をグリコシダーゼやヒドラジン分解で切り離したのち、相互分離と検出を容易にするために、タンパク質に結合していた糖鎖の還元末端を蛍光剤で標識するのが一般である^[6]。しかし、数十種から時には数百種に及ぶ糖タンパク質糖鎖の一斉分離と構造同定を行うのは容易ではない。したがってほとんどの場合、構造解析自体が研究目的になってしまい、その先にある真の目的には届かない。糖鎖の切り離しと相互分離という操作を省き、最短ルートに必要な情報が得られれば、糖鎖解析の速度と質は飛躍的に高まる。この時間差を縮め糖鎖の機能探求にいち早く導くことが、糖鎖プロファイリングの役目である（図2）。糖鎖研究が重要であると多くの研究者が気づいていたにも関わらず、それが進展しなかった理由は有効な糖鎖プロファイリング技術がなかったためと言える。

糖鎖研究の先哲である永井克孝・三菱生命科学研究所長（当時）は糖鎖エンジニアリングプロジェクトのスタートに際し、2003年7月4日付の日本工業新聞（20面）で装置開発の意義について、次のように語っている。「自動化装置がないと、研究にはスペシャリスト以外は入り込めない。専門家の言うことを聞き、許可を得るといような手続きを踏まなくても、自動化装置により、配列が分かり、必要とする糖鎖をつくり出せれば、誰でもやれる。それに

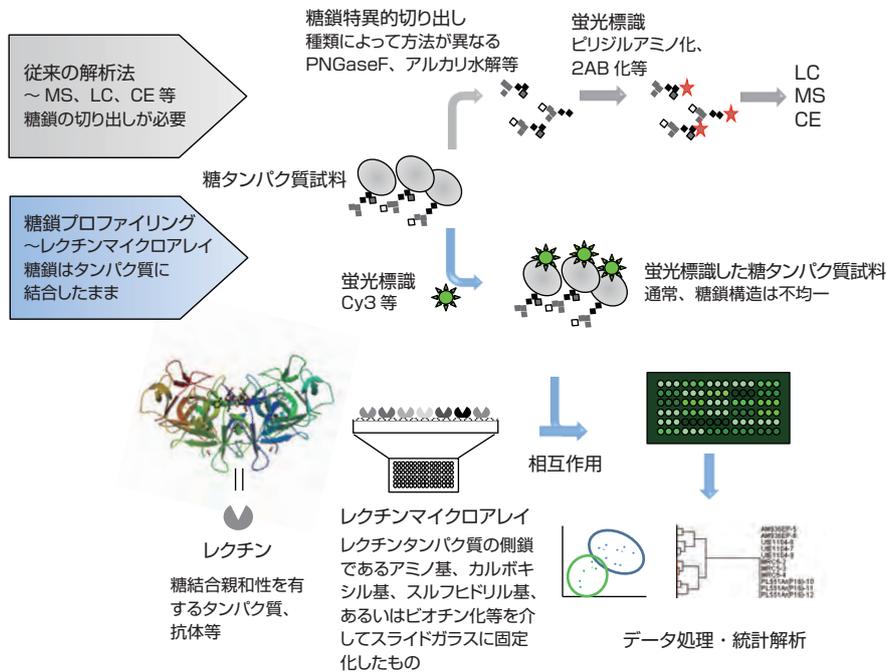


図2 これまでの糖鎖解析法（LC、MS、CE）とレクチンマイクロアレイによる糖鎖プロファイリングによる方法のちがい
前者では構造既知の標準品と比較するため（記憶照合法）、糖鎖を糖タンパク質から切り出す必要がある。MSでは異性体を事前に相互分離する必要があり、解析前にLC等で精製する必要も生じる。これに対し、レクチンマイクロアレイでは糖タンパク質試料をそのまま蛍光標識し、一連のレクチンとの相互作用を一括解析する。レクチンとの相互作用結果がアウトプットに反映されるので、糖鎖構造が同じでもコアタンパク質の種類や濃度が異なることで解析パターンが変化することもある。

より研究者人口が増え、爆発的に進歩する」。糖鎖プロファイリングはまさにこの目的・ニーズに合致したテーマだった。

2 要素技術と新コンセプト「糖鎖プロファイリング」

著者は糖鎖構造中のある特徴に特異的に結合するタンパク質（レクチン）に注目し、多種類のレクチンをスライドガラスにアレイ化した解析プラットフォームを考案した（図3）。いかにも「絵に描いた餅」だが、当時ある種の「新鮮さ」をもって各種学会、フォーラム、勉強会で受け入れられた記憶がある。多くの人が何もないところに新しいイメー

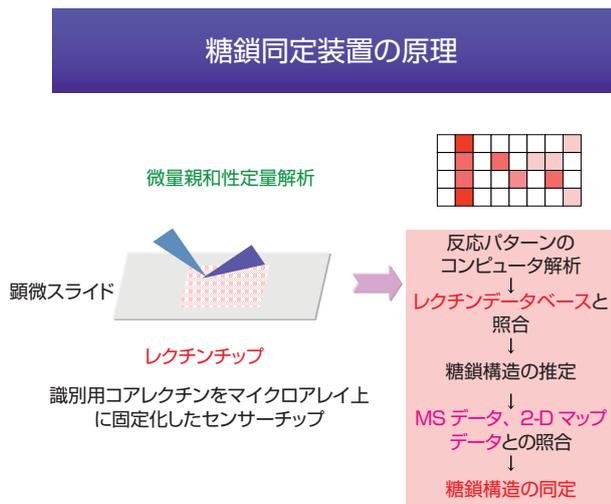


図3 糖鎖プロファイラーの原理を描き表したイメージ図
数十種のレクチン（糖に結合するタンパク質）をスライドガラスのようなガラス基板上に固定化し、そこに適当な標識基で修飾した糖鎖・糖タンパク質を作用させ、特殊な検出原理によってこれを微量検出することを想定した。（2002年7月30日に催されたバイオテクノロジー開発技術研究組合主催の勉強会で実際に使用した著者のプレゼンスライドから転載。）

ジが生まれることを感じたのかもしれない^{[7][8]}。

さて、糖鎖プロファイリングは厳密な化学構造の決定に目的があるのではなく、複数の試料間の構造の「差異」を見いだすことに特徴があると述べた。その原理・発想は突然思いついたものではなく、先行する技術によるイメージが重要なヒントになっていた。以下、糖鎖プロファイリング技術の実現に不可欠となった二つの要素技術について述べる。

1) 先行技術、FACによる原理検証とヘクト・バイ・ヘクトPJ

100のレクチンと100の糖鎖の相互作用を定量分析法FACで解析することで、相互作用情報をデータベース化、個々の糖鎖に（レクチンによって付けられた）固有の「指紋」があることを実験的に立証。

レクチンマイクロアレイが糖鎖プロファイリングの目的に適していることは十分予想できた。しかし、個々の糖鎖に本当に指紋のような固有の情報があるのか、どの程度の数のレクチンを用いれば糖鎖構造の識別が可能かについては、誰も検証していなかった。このため、著者は先行技術であるFACによる網羅的解析を行い、多数のレクチンと多数の糖鎖間の親和力を決定するという作業に挑んだ。

フロントル・アフィニティ・クロマトグラフィー（FAC）は前端分析法とも呼ばれ、1975年、北海道大学（当時）の笠井猷一氏らが開発した定量的相互作用解析法である^[9]。その理論は前年にB.M. DunnとI.M. Chaikenが報告し、後にゾーナル分析法と呼ばれる解析法と本質的に同一である^[10]。FACの操作法と原理を図4に示す。この技術はトリプシン等のプロテアーゼとその基質（阻害剤）との相互作用解析法として編み出されたが、20世紀末にアルバータ大学のD. SchriemerらがMS検出との連結に成功した

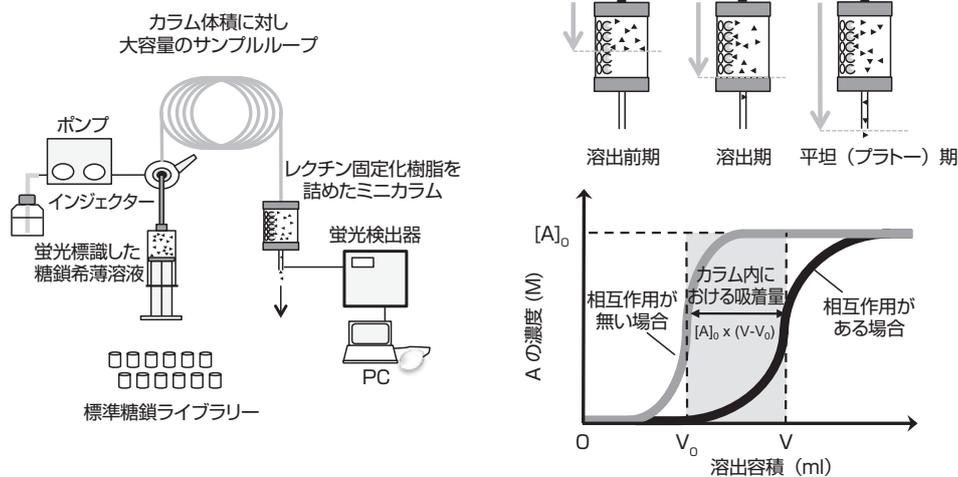


図4 FACの原理（右）と操作法（左）

カラムに固定化したリガンド（レクチン）に糖鎖が相互作用すると、カラムから漏れ出てくる溶出前端（フロント）容量（ V ）が、相互作用の無い対照物（ V_0 ）と比べ大きくなる。この差（ $V - V_0$ ）は糖鎖・レクチン間の親和性を表す尺度である解離定数（ K_d ）と $K_d = B_t / (V - V_0) - [A]_0$ の関係にある（ B_t は用いたカラムにおける有効リガンド量、 $[A]_0$ は糖鎖の初期濃度）。一般にレクチンの糖鎖に対する解離定数は大きく（解離しやすい）、蛍光標識糖鎖は十分希釈して用いるため、 $K_d \gg [A]_0$ が成り立つ。このため上式は $K_d = B_t / (V - V_0)$ となり、用いる糖鎖の濃度に依存しない式となる。FACが弱い相互作用解析に適した方法と言われる所以である。

ことで、ハイスループット化への道が拓けた^[1]。著者は、1998年の国際炭水化物学会(サンジェゴ)に参加した折、D. SchriemerのボスであるO. Hindsgaul(現、カールスバーグ研究所)による「Whistler Award」の受賞講演を何気なく聴いた。Hindsgaulは講演の最後の部分で、「とっておきのニュースがある」と切り出した。上記、笠井献一氏が20年前に編み出したFACを、コンビナトリアル化学で合成した化合物スクリーニングに応用展開したというのだ。彼らは10 cm程度のPEEK製チューブにレクチンを固定化したビーズを充填し、この「カラム」を巧妙な手製デバイスを介してESI・MS装置に直結させるという離れ業をやっていた。著者は仰天した。著者のボスの名前が突然受賞講演で登場したこともあるが、何より彼らのやったことは今までのFACの常識を覆すことだった。

著者は発奮せずにはいらなかった。ちなみに、当時、同僚たちはガラス製のオープンカラムとフラクションコレクターを用いて分析を行っていた。この先入観を捨てSchriemerとは異なる方法で、迅速、高感度、ハイスループット化への道を模索した。MS装置など、当時の地方大学では手に入らなかったが、かわりに研究室には、共同研究先メーカーが置いて行った古いイソクラティック式の液体クロマトグラフィー(LC)用ポンプ1台と蛍光検出機があった。都合のよいことに、当時市販されて間もないピリジルアミノ化糖鎖

(PA糖鎖)という蛍光標識された標準糖鎖が何種類か手元にあった。これらを何とかモノにできないかと思いを巡らしていたある日、「発想の転換」が訪れた。FACでは薄めたアナライト(分析物)をカラム体積に対し過剰量流すことで、アフエニティー保持の破綻を「前端容量」として観察する。この二つの「体積」の関係を保つことが分析には不可欠なので、「カラムサイズを極力小さくし、逆にアナライトをその20倍以上の容量をもつサンプルループを使って注入できないか」と考えた。LCでは通常分離能を維持するため小容量のサンプルループを用いるので、わざわざループを長くすることは想定外だった。しかし、適当な内径のPEEKチューブを数メートル用いれば20:1の体積比を簡単に達成できることがわかった。

試行錯誤の結果、カラムは市販のガードカラム(内系4 mm、長さ10 mm、体積126 μl)で代用できた。ここにPA糖鎖の溶液を2 mlのサンプルループを介して一定流速で注入した。溶出してくるPA糖鎖の蛍光を蛍光検出器につないだインテグレータにより追跡した。カラムには、手始めに市販の植物レクチンを固定化したアガロース樹脂を詰めた。すると、相互作用のあるとされるPA糖鎖は遅れて溶出され、そうでない糖鎖は素通りして溶出された(図5左のクロマトグラム参照)^[12]。ある日、この溶出曲線の美しさに感激した同僚の荒田洋一郎氏(現、城西大)は、蛍

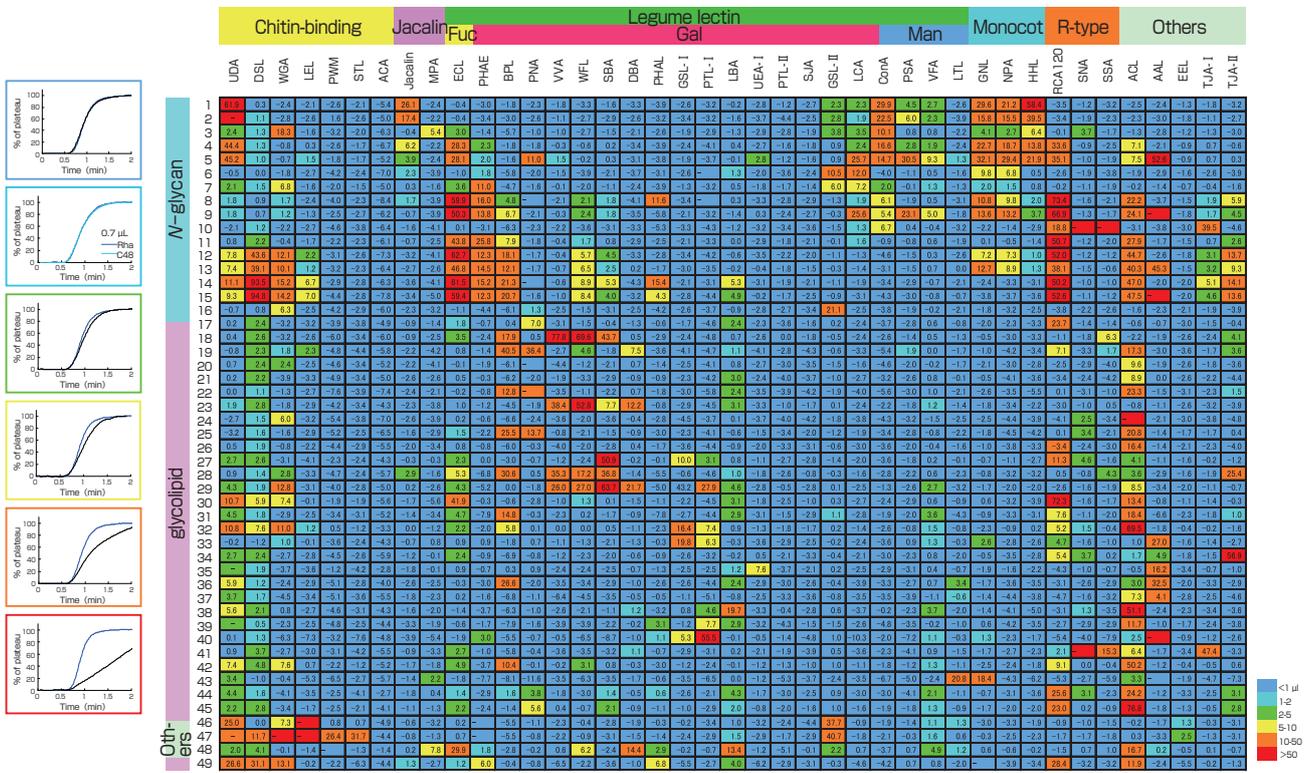


図5 ヘクト・バイ・ヘクトPJによって産出されたレクチン・糖鎖相互作用のデータ(一部) 相互作用の度合いは溶出前端的遅れ(V-V₀)として観察される。マトリックスでは最も強い相互作用を赤で、相互作用の無いケースを青で示している。

光検出器が読み取るデジタルデータをPC変換し、溶出前端容量（図4におけるV値）を自動算出するアルゴリズムを開発してくれた^[13]。高性能蛍光検出式FACの原型が誕生したのである。

その後、FACは改良を重ね、自動FACとして（株）島津製作所から受託製造販売された^[註4]。著者らの開発した蛍光検出を用いるFACはSchriemerらのMS直結式のFACとは操作法や用途が異なり、ほとんど独立した技術として位置づけられている^{[14][15]}。高性能FACは、冒頭述べたNEDO「糖鎖エンジニアリング」（SG）プロジェクトでヘクト・バイ・ヘクトPJ^[註5]として先陣を切る働きをした。ここでは、多くの既知・新規レクチンの特異性解析が今までにないスピードでなされた。しかし、高性能FACがもたらした最も重要なことは、各糖鎖に、さまざまなレクチンとの反応性という意味で、固有のパターンがあることを明らかにした点だ。すでにそのことは、大学でマニュアル装置をいじっていた時に感じてはいたが、ヘクト・バイ・ヘクトPJの膨大なデータ（図5）は、このことが正しいことを実証した。図5のマトリックスは縦軸（糖鎖の種類）と横軸（レクチンの種類）から構成され、それぞれのマス目が相互作用の強弱を表す。赤が最強、青が相互作用無し、を意味する。さて、このマトリックスを「縦方向」に切ってばらばらにして見ると、各短冊のパターンが異なることに気付く。このことは、各レクチンの糖鎖特異性に違いがあることを示すので、従来からのものを見方を確認しているに過ぎない。では「横方向」に切ったらどうか。各短冊に示された糖鎖毎のレクチンに対する親和性パターンがやはり相互に異なることがわかるだろう。このことは、レクチン親和性という「測り」にかけたとき、それぞれの糖鎖が異なる「指紋」を示すことを示している。

もし、FACが高性能化されなければ、スルーット向上によって数多くのデータを一覧することはできなかった。FACが弱い相互作用の測定に特に優れた方法であることを思い起こしてほしい（図4の説明参照）。多くの相互作用測定法は強い結合を探すことに適していて、弱い相互作用を測定することに主眼を置いていない。FACでは弱い相互作用に対しても正確に親和力（解離定数の逆数、 $1/K_d$ で表される）を求めることができるので、図5のマトリックスには豊かな相互作用情報が付与され、よって糖鎖固有の指紋も容易に見つけることができた。原理証明はできたので、あとは、どのようにして実際に糖鎖プロファイラーを構築するかである。

2) エバネッセント波励起蛍光検出法

レクチンアレイに蛍光標識した糖タンパク質を結合させ、洗浄操作なしに液相状態のまま結合分子を選択的に

検出する方法。相互作用が弱い糖鎖に有効。

新しい研究のアイデアはしばしば、およそ同時期に別のグループが独立に思いつく。事実、著者らがエバネッセント波励起蛍光検出原理によるレクチンマイクロアレイの開発に成功し、論文発表した2005年には、他に3つの研究グループがレクチンマイクロアレイ原理に関する論文を発表している^{[16][19]}。論文はずっと後発だったが、イスラエルのベンチャーであるプロコグニアも、これに先立ちいち早くレクチンアレイプラットフォームの開発に注力していた（<http://www.procognia.com/>）。レクチンマイクロアレイの原理開発に関する論文はその後さらに数編発表されるが^{[20][21]}、その着想には、FACではなく、Serial lectin-affinity chromatography法と呼ばれる先行技術の存在が影響している。この方法では、数種のレクチンカラムを用意し、そこにトリチウム等で放射性標識した糖鎖を順次流し、その吸着の程度（強、弱、無など）を調べて、糖鎖構造を推定する^{[22][24]}。理にはなっているが、手間と時間がかかるため、多くの分析研究者がより簡便な方法への転換を密かに考えていたにちがいない。一方、FACも高性能化されたが、LCであるため多検体の同時解析はできず、解析対象も精製糖鎖に限られる。研究開発の現場で求められるのは細胞抽出液や血清等を直接、自在に扱える技術である。

ここで、著者らがレクチンマイクロアレイ開発で主眼を置いたのは検出原理である。エバネッセント波^[註6]を蛍光の励起光として用いる技術は昔から知られており、エバネッセント顕微鏡等にも応用されていた。それをレクチンマイクロアレイというスライドガラス上で用いるには、顕微鏡のような微小領域ではなく、広視野への応用を可能にしなければならない。著者が産総研入所前に調べたところ、スライドガラスの端面から励起入射光を入れる方式でDNAマイクロアレイの開発を行っている日本レーザ電子（当時）というベンチャー企業があった。社のホームページに掲載されたエバネッセント波の説明図を参考にエバネッセント波励起蛍光検出のレクチンマイクロアレイの構想を描いた（図6）。

この技術の一つの特徴は、エバネッセント波をガラスの端面から入射して蛍光励起する点である。エバネッセント波はガラス表面からごく近接領域（ $< 100 \text{ nm}$ ）にしみ出る光なので、レクチン等を固定化したスライドガラスの表面付近にトラップされた蛍光標識糖鎖（実際には糖タンパク質）が選択的に励起される。レクチンと糖鎖間の親和力が、DNA・DNA（RNA）や抗体・抗原間のそれと比べ一般に弱いことを述べた。すなわち、レクチンに弱く結合している糖タンパク質は、反応後洗浄操作をすると容易に引き剥がされてしまうので、通常用いられる共焦点式蛍光スキャナーでは、この結合を見逃してしまう。FACで観測さ

れた糖鎖・レクチン間の解離定数 (K_d) はせいぜい 10^{-6} M (1 μ M) であり、多くが 10^{-4} M (100 μ M) 前後である抗原・抗体反応と比べ 100 倍以上弱いことになる。ガラス端面から入射することのもっとも重要な利益は、ガラス表面の全域がエバネッセント波で励起されることである。顕微鏡のような微小領域ではなく、マイクロアレイというプラットフォームにおけるハイスループットな解析作業はこの端面入射によって達成される。事実、この点は後の特許査定に際し重要なポイントとなった。エバネッセント波励起法を用いる副次的な利点も多い。洗浄操作がいらないので、操作が簡便になり、解析時間の短縮と再現性の向上に結びつく、などである。

今日まで、エバネッセント波励起式のスキャナーを用いているのは著者らのグループのみであり、他はすべて共焦点方式（洗浄操作が必要）を採用している。しかし、それでもレクチンアレイとして一応機能しているのは、実際に解析する糖鎖が多数の場合、糖タンパク質では多価の状態になっていて、オリゴマー構造をとるレクチンへの親和力が実用上十分高いことが理由として考えられる^[25]。ちなみに、切り出された糖鎖の結合を測定できた例は、本エバネッセント波励起法によるものだけである^[26]。しかし、本システムを用いる実際上の利点は何を置いても検出感度の高さであろう。洗浄操作を不要とする本原理において、ある意味当然と取られるかもしれないが、現実にはそれほど単純ではない。高出力ハロゲンランプの採択は高感度化に必須であったが、それ以上に、バックグラウンドの低減化は重要であった。具体的には、光学的に最適なフィルター、スライドガラスの選択、生化学操作における固定化法、ブロッキング法の最適化、画像処理における各種ノウハウ等であ

る。他機種との厳密な性能比較は難しいが、論文等で報じられている試料の使用量、使用者の感想等から、本エバネッセント波励起式蛍光検出スキャナーの検出感度は糖鎖関連装置の中でトップに位置する。現システムにおける公称の検出限界値は、RCA120 レクチンに対するアジアロフェツイン（代表的血清糖タンパク質フェツインの末端シアル酸を酸処理して除いたもの）、およびアジアロ 2 本鎖複合型 N グリカンそれぞれで 100 pg/ml、100 pM である（使用量約 0.1 ml）^[26]。レクチンマイクロアレイ (LecChipTM) とともにエバネッセント波励起式蛍光スキャナー (GlycoStationTM Reader 1200) は 2006 年 10 月、モリテックス（当時）から製造、販売された。

3 装置開発まで：企業連携と知財戦略～バイオベンチャーの現実

2002 年度補正予算でスタートした NEDO「糖鎖構造解析技術開発プロジェクト」であったが、レクチンアレイ開発に臨むパートナー企業の日本レーザー電子がスタート直後、経営困難で躓き、翌年経営破たんしてしまう。しかし、その間産総研は単独でレクチンアレイの原理開発に成功する。開発を担当していた久野敦氏と内山昇氏の活躍があって、糖鎖プロファイリング原理、およびレクチンアレイ解析法に関する基本特許を 2003 年 12 月 25 日に出願した。その後、(株)モリテックス NLE プロジェクトグループに事業継承されたレクチンアレイ関連グループは、大企業がもつ経営基盤と技術基盤に支えられ、日本レーザー電子時代の面影を強く残す試作 1 号機とは装いも新たに、製品第一号として本格的な装置が完成した。本成果は NEDO の成功事例としても注目された (http://www.meti.go.jp/committee/summary/0002220/024_02_12b.pdf)。ところが、2008 年世界を襲ったリーマンショックを境に会社経営が急激に悪化し、バイオ関連事業は分社化される。紆余曲折の末糖鎖メンバー 10 数人が GP バイオサイエンス (株) を設立する。この会社は関連業界のバイオベンチャーとして注目され、NEDO の「研究開発のその後を追う：シリーズ 1」でも紹介されたが (http://www.nedo.go.jp/hyokabu/jyoushi_2008/gp/index.html)、経営のやりくりはやはり大変で、結局 2013 年 4 月に破産申請と言う局面を迎えてしまう。

4 展開

1) 糖鎖医工学研究センターと糖鎖産業技術フォーラム (GLIT)

話が前後するが、上述のように、糖鎖プロファイリング技術は 2003 年 12 月に基本特許出願、2005 年 12 月に

NEDO Glycan Engineering Project S&G

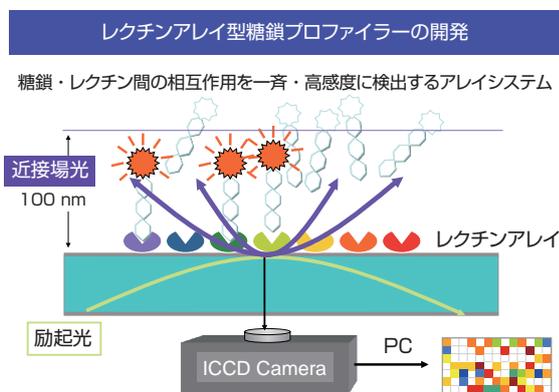


図6 エバネッセント波励起式蛍光検出法によるレクチンマイクロアレイの原理を描いた図
糖鎖エンジニアリングプロジェクトのキックオフを兼ねた日本糖鎖科学コンソーシアムの第一回会議（2003年11月3日、東京）で使用されたスライドを元に作成。前出の図3と比べるとかなり進歩している。

論文発表され、2006年4月糖鎖機能解析を主体とするNEDO新規プロジェクト「糖鎖機能活用技術開発」(MG: Medical Glycomics)が発進する。そして同年12月、医療分野での糖鎖活用を目指す糖鎖医工学研究センターが設立された(成松久研究センター長)。新センターの目標の一つは、これまで蓄積した糖鎖研究成果の普及だった。そのためには、ノンコンペティティブな基礎・基盤研究の状態から、優れた成果をすみやかに産業界へと橋渡しする場が必要と考えた。そこで、産総研内外の関係者と協議を重ね、「糖鎖産業技術フォーラム」(GLIT: Glyco-innovation and Industrial Technology; <http://www.glit.jp/wp/>)を各種業界団体、関係者とともに立ち上げた。GLITはバイオインダストリー協会(JBA)との共同事業の一環として各種研究会やシンポジウムを通し、産業界に向け糖鎖先端技術の普及と人材交流活動に尽力した。産総研の活動としても新たな取り組みだったことから、所内外でも注目された。産学連携推進の実質的な原動力になる半面、成果主義的な組織ではなく連携推進のためのワンストップ組織だったことから、常に次に何をすべきかを議論し続けなければならなかった。GLITの実質運営には糖鎖医工学研究センター内に新たに設置した連携戦略班の新聞陽一班長が大きく貢献した。

GLITが直面した課題は、バイोजパン2008のパネルディスカッション用の以下のスライドにもある程度反映されている。すでに5年前の議論であるが、糖鎖を含むバイオ研究の今後を占う上で参考になる点も多い。

- 日本の糖鎖研究の位置付けは、世界的にも突出した技術とコア・リソースの保有によりトップレベルにある。
- しかし、さまざまな要因による研究開発の長期化は予算獲得を困難にしている。
- その結果、企業や大学は、新たな糖鎖技術の利用に対し踏み出す「きっかけ」を必要としており、先端技術の利用・普及には多くの課題を残す。
- ブレークスルーを目指すには、これらの課題を戦略的にクリアしていくことが重要。
- 本ディスカッションでは現状分析と課題把握を通し、今後の戦略(技術・人材・しくみ)について討議することで意識の共有を図りたい。

GLITの応援もあり、GPバイオサイエンスのエバネッセントスキャナー、GlycoStation™ Reader1200は15台の販売実績を上げている(2013年7月現在)。すでにバイオ関連企業は糖鎖の重要性に気付き、さまざまな業種が糖鎖に興味を示している。ある企業はバイオ医薬品開発や再生医

療、さらに腫瘍マーカー等のバイオマーカー診断システムの開発に乗り出している。GlycoStation™ Reader 1200は、バイオ医薬品(特にバイオシミラー)開発支援で海外でも注目を浴びている^[27]。

販売当初は、学術論文における本システムの使用実績が著者らの研究室が独占状態であったが、現在では形勢が逆転しつつある。販路開拓を進めるが故の学術的なコンフリクトもしばしば発生していることも事実である。GLITはその役割をすでに終えたのかもしれない。しかし、GLITの活動とレクチンマイクロアレイは常に連動していたし、多くの技術を先導してきた。最近、レクチンマイクロアレイの集大成と言うべき総説を著者他、開発者グループ(山田雅雄、久野敦、館野浩章)が著したので詳細はそちらを参照されたい^[28]。

以下に、いくつかの研究テーマについてレクチンマイクロアレイ、およびその応用展開がうまく機能した例を示す。

2) バイオ分野における実用化例

上記MGプロジェクトでは、がん等の慢性疾患に注目し、肝線維化マーカーや難治性の肝内胆管がんマーカー等で優れた成果を上げた。いずれの場合もレクチンマイクロアレイが重要な役割を果たした(詳細は成松による文献[2]を参照)。糖鎖医工学研究センターの主軸であったMGプロジェクトを成功に導く一端をレクチンマイクロアレイが担った。開発者としてこれに勝る喜びはない。

さて、レクチンマイクロアレイの応用が最初に進んだのは、幹細胞である。国立成育医療センター研究所の梅澤明弘部長(現、副所長)との協力関係構築のもと、成育医療センターの有するバイオリソースを利用した間葉系幹細胞のラインアップに加え、マウスES(胚性幹細胞)やEC(胎児性がん細胞)の解析も行った^{[29][32]}。解析のストラテジーは2006年におよそ出来上がり、翌年には解析プラットフォームの成育医療センターへの技術移転を果たすために、著者はNEDOの橋渡し技術研究開発に関するプロジェクトに参画した(正式名:基礎研究から臨床研究への橋渡し促進技術開発/橋渡し促進技術開発/糖鎖プロファイリングによる幹細胞群の品質評価、安全評価システムの研究開発、開発期間:2007年10月~2009年3月、先導研究)。研究が開始される時、山中伸弥教授による「ヒトiPS細胞作製に成功」とのニュースが入ってきた。世界中が遺伝子リプログラミングの事実に驚嘆した。

残念なことに、当時、幹細胞の糖鎖解析を行っている研究者はほとんどいなかった。しかし、未分化細胞の表面マーカーとして知られているSSEA-1/3/4や、Tra1-60/81は紛れもなく糖鎖マーカーである。未分化細胞も含め、さまざまな細胞を、均質に調製できれば、それらの糖鎖プロファ

イルには明確な違いがあることを示せるはずである。間葉系幹細胞は不均一なので、iPS 細胞や ES 細胞こそ比較糖鎖プロファイリングの検証対象とすべきものと考えた。

そこで、上記橋渡し促進プロジェクトに続き、著者らは幹細胞を対象とした糖鎖プロファイリングをより本格的に推進するため、浅島誠器官発生工学研究ラボ長(当時)のグループと連携し、新規 NEDO プロジェクト(iPS 細胞等幹細胞産業応用基盤技術開発、2009 年 4 月～)に参加した。諸事情によりこのプロジェクトは 2 年で終了するが、その間に多岐に及ぶ未分化細胞の解析を精力的に進めた。

2006 年からレクチン応用開発チームに加わった館野浩章氏が系をリファインし、組み換えレクチンを含む 96 種のレクチンからなる高密度レクチンアレイを新たに開発していた。その「切れ味」を試すには 100 種強の ES/iPS 細胞は格好の題材だった。その後、著者らは幹細胞工学研究センターの伊藤弓弦研究チーム長、小沼泰子主任研究員らと協力連携し、一連の幹細胞を対象とした糖鎖プロファイリングを強力に推進した。その後の成果は、プレスリリース等で紹介される機会もあったため、ご存じの方もいると思うが、以下、時系列に沿った研究の展開を記す。

①糖鎖リプログラミングの事実

新たに開発した 96 レクチン搭載の高密度レクチンアレイを用いて 100 種を超えるヒト未分化細胞(ES/iPS)を解析した。その結果、体細胞にはない、未分化細胞に共通する特徴的な糖鎖構造をいくつか抽出した。その結果、山中 4 因子の導入により糖鎖構造もリプログラミングされることが初めて観察された^[33]。中でも、すべての未分化細胞に共通して反応する rBC2LCN と呼ぶ組み換えレクチンは、iPS 細胞作製の元となった親細胞(体細胞)とはまったく反応しないことから、rBC2LCN が新たな未分化マーカー検出のプロープとなることが示された^[注 7]。

②iPS細胞と体細胞の糖鎖構造を定量比較解析

代表的な iPS 細胞である 201B7 とそのもとになる皮膚繊維芽細胞を大量に調製し、MS、グリコシダーゼ消化を組み合わせた LC マッピング法で糖タンパク質糖鎖(N グリカン、O グリカンとも)の総合解析を行った。①のレクチンマイクロアレイによる観察が実際に確認され、N グリカンにおけるシアル酸結合様式の α 2-3 型から α 2-6 型への劇的なシフト等が確認された^[34]。上記 rBC2LCN が認識可能な糖鎖未分化マーカーが実際何なのか注目されたが、H タイプ 3 構造(Fuc α 1-2Gal β 1-3GalNAc α)を有する構造が O グリカンの中に特異的に見つかった。

③rBC2LCNは未分化細胞を生きのまま染色できる

通常フローサイトメトリーや組織染色では抗体がプローブとして用いられる。上記表面マーカー SSEA-1/3/4 や Tra1-

60/81 も抗体で検出するが、その際細胞を固定化するのが一般的である。フォルマリンやグルタルアルデヒドで膜を処理するので細胞は死んでしまうが、rBC2LCN は生細胞の状態でも十分な結合力をもつことがわかり、さらに未分化細胞を薬剤で分化誘導すると染色性は速やかに消失した^[35]。抗体と比べた場合の開発コストが低いことなど、今後の実用化を考えた場合、多くの利点をもつことを特記したい^[注 8]。
④rBC2LCNのリガンはポドカリキシンに提示されたHタイプ3構造である

ポドカリキシンは、腎臓やある種のがん細胞で発現が見られる巨大分子量の糖タンパク質である。シアロムチンとあって、細胞外ドメインのほとんどが無数の O グリカンで覆われていると予想されている。上記未分化マーカーを認識する rBC2LCN が実際に未分化細胞上のどの糖タンパク質を認識しているのかは、未分化メカニズムを解明する上でも重要な問題だが、遺伝子発現や分子構造上の特徴などから本分子を割り出し、ポドカリキシンに対する抗体を用いて標的の特定に至った^[36]。ポドカリキシンが無数の O グリカン含有すること、rBC2LCN が特異的に結合していること、H タイプ 3 構造を有する O グリカンが iPS 細胞(201B7)から同定されていることなど、今までの観察がすべて一本の糸でつながった^[注 8]。

5 今後の展開

バイオマーカー探索や幹細胞評価技術以外にも、レクチンマイクロアレイは多方面での活用が示されている。GlycoStationTM Reader 1200 の使用例は、論文公表されたものだけでも約 60 報だが、そのうちの 1/3 がすでに著者らとの直接かかわりのない完全な外部研究機関によるものである。外国研究機関からの論文も 10 件ほどある。この論文ではほとんど触れなかったが、バイオ医薬品(特にバイオシミラーと呼ばれる後続品)開発における本装置の需要は今後急速に増えるだろう。

最近、糖鎖が幅広い生命科学にまたがる基幹科学だと米国 NAS (National Academy of Science) が報告し、注目されている。“Transforming Glycoscience (変貌するグライコサイエンス)”と題される本報告書では、糖鎖が「健康」、「物質」、「エネルギー」の 3 大テーマで特に重要である点、今後、糖鎖科学の飛躍的発展が世界レベルで起こることを予告している^[37]。糖鎖が専門家の領分から解き放たれ、大きな飛躍とグローバル化を迎えようとしている。

糖鎖のデータや技術を集めた成書はよくある。それに対して、近々スプリングer・ジャパン編集の著書の発刊趣旨は「糖鎖の周辺領域で話題になっているトピックス」を糖鎖以外の研究者へ紹介することである^[38]。バイオの研究に

においては、気付く、気付かざるにかかわらず、糖鎖課題に面しているはずである。我々が糖鎖を研究する理由は、それが重要で、普遍的で、そして難しいからである^[39]。糖鎖の存在が極めて幅広い点を忘れてはいけない。このことは糖の起源が古いことの裏返しでもある。逆説的な表現になるが、「糖鎖は重要だから存在するのではなく、存在したから重要になった」と言うのが著者の考えである^[40]。

合成技術には大きな課題が残されている。均質な糖鎖によるバイオ医薬品づくりはバイオロジクスの大きな目標である^[41]。ツールとして評価されつつあるレクチン(アレイ)であるが、レクチン自身も大化けする時が来るかもしれない。

6 総括:この技術の構成要素と融合の契機

最後に、本レクチンマイクロアレイ技術がどのように構成されていったのか、核となる技術要素とそれらの融合、ブレークスルーとなる契機を検証してみたい(図7)。まず、糖鎖に対する解析技術開発のニーズがあったこと。そして、これを開発する契機が2002年に著者に訪れる。当時著者は大学でFACの高性能化を達成するが、このことはレクチンを利用して糖鎖のプロファイリングが可能という発想の転換の契機を与える。およそその直後に産総研への入所、糖鎖構造解析プロジェクトへの参加が決定し、当時絵に描いた餅に過ぎなかった糖鎖プロファイリングの構想が、関連企業との連携、原理検証を経て着実に推進される。2003年基本特許の出願、2005年学術論文の発表、2006年糖鎖プロファイラーの上市が順調に達成される。しかし、この技術の開花はそれ以降も、次の糖鎖機能解析プロジェクトにおけるバイオマーカー開発で活用されるほか、GLIT

という成果促進のための組織活動により、より幅広い活路を見いだしていく。このことは糖鎖の産業界への橋渡しを強く後押しした。一方、あらたな応用展開の一つとして、幹細胞評価技術におけるrBC2LCNという新規未分化マーカー検出プローブの発見がある。これは再生医療における未分化細胞の検出、除去という新たな筋道や、組み換えレクチンへのシフト、という新たな展開への推進力にもなっている。レクチン工学と言う新しい学問領域への突破口が開けたとみるべきかもしれない。

一連の出来事を振り返り、もっとも重要なポイントは何であったか。著者は糖鎖・レクチン間に代表される「弱い相互作用」への徹底した技術探求ではなかったか、と思う。FACが原理的にそれを達成しえたが、糖鎖プロファイリングという着想にたどり着くには高性能化によるハイスループット化が必要であった。しかし、FACでは生体組織由来の粗抽出液は扱えないため、レクチンアレイという全く別のプラットフォームに鞍替えすることが必要であった。そこで、弱い相互作用を捉えることが可能なエバネッセント波励起法に注視した。同時期にレクチンアレイを考案するグループは複数あったが、結局最終性能を出しうる製品開発にまで漕ぎつけたのは、著者らのグループのみであった。弱い相互作用を検出可能とするエバネッセント波励起蛍光検出原理に躊躇なく拘ったのは、実は著者がこの光学分野の素人であり、それ以外の技術によそ見をしなかったためかもしれない。事実、理論上「エバネッセント=高感度」ではないが、本開発によるエバネッセント波励起式スキャナーの精度・感度を上回る装置は今日まで出現していない。

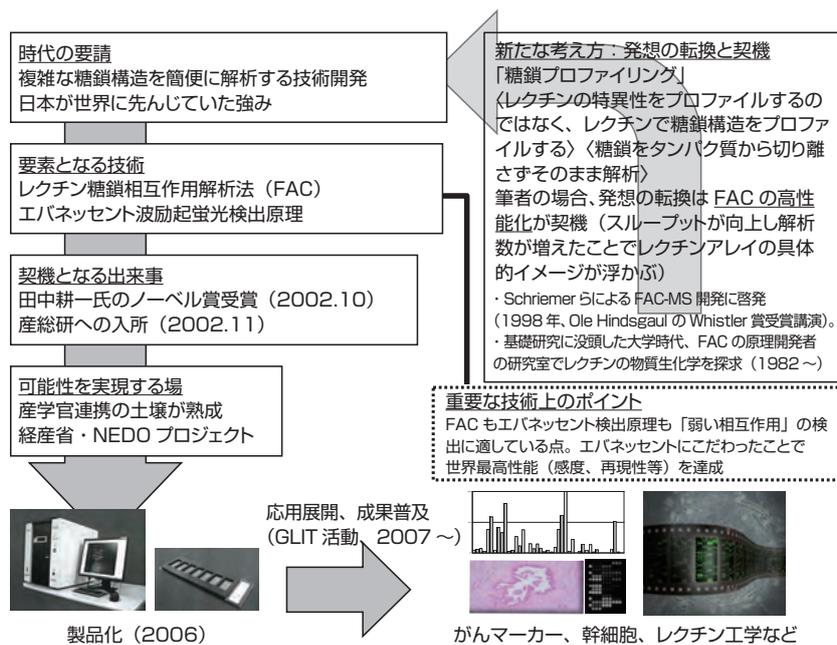


図7 レクチンマイクロアレイ技術の構成に関するまとめ

注1) 糖鎖は構造が複雑で機能不明であることから欧米先進国は大型研究費の投入には消極的であった。これに対し我が国は施策的にも糖質・糖質研究に理解があり、日本人研究者が興味半分・信念半分(?)で始めたグリコシダーゼに代表される酵素探索や構造解析技術の開発に国としてバックアップしてきた。さらに生化学的な精製技術の高さも、糖鎖リソースの蓄積とノウハウの基礎を強固なものとし、気づけば糖鎖関連特許・論文で他国を圧倒していた。一方、海外でも糖鎖に注目する動きは以前からあり、糖鎖生物学 (glycobiology) という新学問領域の立ち上げに関しては興味深い背景がある^[1]。

注2) 抗体が認識する抗原決定基のこと。より広くは結合認識にかかわる構造部分を表す。

注3) 構造既知の標準品との照合により構造を同定する方法で、記憶照合法とも。NMRやMSにおけるメチル化分析法など直接構造決定を行う方法と区別される。

注4) プロジェクト立ち上げ前の勉強会で知り合った(株)島津製作所の田中耕一氏にLC部門への橋渡しをお願いした。その後氏はノーベル賞受賞でプロジェクトへの参加を見送ることになった。

注5) 100のレクチンと100の糖鎖(構造既知の標準品)間の相互作用をFACで網羅的に解析しようというプロジェクト。レクチン集めにはホーネン(現、(株)J-オイルミルズ)の亀井麻直氏が全国行脚し、データ解析には三井情報開発(株)(現、三井情報(株))の菊池紀広氏と高橋順子さんが当たった。表1参照)。産総研で本プロジェクトを先導したのは特別研究員(当時)の中村祥子(旧姓)さんであった。

注6) 「束の間の光」の意で、エバネッセント場 (evanescent field)、近接場光 (near optic light) とも。電磁波(光)の反射現象において、特定の条件下で反射する媒質内部に発生する浸透性の電磁波のこと。ニコンの下記サイトにわかりやすい説明あり。<http://www.nikon.co.jp/profile/technology/rd/core/optical/evanescent/index.htm>

注7) 2011年6/22、産総研プレスリリース：糖鎖の迅速プロファイリング技術でiPS細胞を精密評価－高密度レクチンアレイにより幹細胞に共通した糖鎖構造を確認－

注8) 2013年3/19、ヒトiPS細胞を生きたまま可視化できるプローブを開発－細胞の状態を確認しながらの効率的な培養が可能に－産総研プレスリリース：糖鎖の迅速プロファイリング技術でiPS細胞を精密評価－高密度レクチンアレイにより幹細胞に共通した糖鎖構造を確認－

参考文献

- [1] A. Varki and N. Sharon: *Essentials of Glycobiology, 2nd edition* (edited by A. Varki, R.D. Cummings, J.D. Esko, H.H. Freeze, P. Stanley, C.R. Bertozzi, G.W. Hart and M.E. Etzler), Cold Spring Harbor Laboratory Press (2009).
- [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学研究センターの研究戦略, *Synthesiology*, 5 (3), 190-203 (2012).
- [3] E. Yasuda, H. Tateno, J. Hirabayashi, T. Iino and T. Sako: Lectin microarray reveals binding profiles of *Lactobacillus casei* strains in a comprehensive analysis of bacterial cell wall polysaccharides, *Appl. Environ. Microbiol.*, 77 (13), 4539-4546 (2011).
- [4] A. Shibazaki, H. Tateno, A. Ando, J. Hirabayashi and T. Gono: Profiling the cell surface glycome of five fungi using lectin microarray, *J. Carb. Chem.*, 30 (3), 147-164 (2011).
- [5] N. Takahashi: Three-dimensional mapping of N-linked oligosaccharides using anion-exchange, hydrophobic and hydrophilic interaction modes of high-performance liquid chromatography, *J. Chromatogr. A*, 720 (1-2), 217-225 (1996).
- [6] S. Hase, S. Hara and Y. Matsushima: Tagging of sugars with a fluorescent compound, 2-aminopyridine, *J. Biochem.*, 85 (1), 217-220 (1979).
- [7] J. Hirabayashi and K. Kasai: Glycomics, coming of age!, *Trends Glycosci. Glycotechnol.*, 12 (63), 1-5 (2000).
- [8] T. Feizi: Progress in deciphering the information content of the 'glycome'--a crescendo in the closing years of the millennium, *Glycoconj. J.*, 17 (7-9), 553-565 (2000).
- [9] 平林淳: フロンタル・アフィニティクロマト分析法, *生物工学学会誌*, 89 (7), 394-397 (2011).
- [10] K. Kasai, Y. Oda, M. Nishikata and S. Ishii: Frontal affinity chromatography: theory for its application to studies on specific interactions of biomolecules, *J. Chromatogr. B*, 376, 33-47 (1986).
- [11] D.C. Schriemer, D.R. Bundle, L. Li and O. Hindsgaul: Micro-scale frontal affinity chromatography with mass spectrometric detection: a new method for the screening of compound libraries, *Angew. Chem. Int. Ed.*, 37, 3383-3387 (1998).
- [12] J. Hirabayashi, Y. Arata and K. Kasai: Reinforcement of frontal affinity chromatography for effective analysis of lectin-oligosaccharide interactions, *J. Chromatogr. A*, 890 (2), 261-271 (2000).
- [13] Y. Arata, J. Hirabayashi and K. Kasai: Application of reinforced frontal affinity chromatography and advanced processing procedure to the study of the binding property of a *Caenorhabditis elegans* galectin, *J. Chromatogr. A*, 905 (1-2), 337-343 (2001).
- [14] E.S. Ng, N.W. Chan, D.F. Lewis, O. Hindsgaul and D.C. Schriemer: Frontal affinity chromatography-mass spectrometry, *Nat. Protoc.*, 2 (8), 1907-1917 (2007).
- [15] H. Tateno, S. Nakamura-Tsuruta and J. Hirabayashi: Frontal affinity chromatography: sugar-protein interactions, *Nat. Protoc.*, 2 (10), 2529-2537 (2007).
- [16] S. Angeloni, J.L. Ridet, N. Kusy, H. Gao, F. Crevoisier, S. Guinchard, S. Kochhar, H. Sigrist and N. Sprenger: Glycoprofiling with micro-arrays of glycoconjugates and lectins, *Glycobiology*, 15 (1), 31-41 (2005).
- [17] K.T. Pilobello, L. Krishnamoorthy, D. Slawek and L.K. Mahal: Development of a lectin microarray for the rapid analysis of protein glycopatterns, *ChemBioChem*, 6 (6), 985-989 (2005).
- [18] T. Zheng, D. Peelen and L. M. Smith: Lectin arrays for profiling cell surface carbohydrate expression, *J. Am. Chem. Soc.*, 127 (28), 9982-9983 (2005).
- [19] 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).
- [20] R. Rosenfeld, H. Bangio, G.J. Gerwig, R. Rosenberg, R. Aloni, Y. Cohen, Y. Amor, I. Plaschkes, J.P. Kamerling and R.B. Maya: A lectin array-based methodology for the analysis of protein glycosylation, *J. Biochem. Biophys. Methods*, 70 (3), 415-426 (2007).
- [21] S.C. Tao, Y. Li, J. Zhou, J. Qian, R.L. Schnaar, Y. Zhang, I.J. Goldstein, H. Zhu and J.P. Schneck: Lectin microarrays identify cell-specific and functionally significant cell surface glycan markers, *Glycobiology*, 18 (10), 761-769 (2008).
- [22] K. Kornfeld, M.L. Reitman and R. Kornfeld: The carbohydrate-binding specificity of pea and lentil lectins, *J. Biol. Chem.*, 256 (13), 6633-6640 (1981).
- [23] K. Yamamoto, T. Tsuji, I. Matsumoto I and T. Osawa: Structural requirements for the binding of oligosaccharides and glycopeptides to immobilized wheat germ agglutinin, *Biochemistry*, 20, 5894-5899 (1981).
- [24] R.D. Cummings and S. Kornfeld: Fractionation of asparagine-linked oligosaccharides by serial lectin-Agarose affinity chromatography, *J. Biol. Chem.*, 257 (19), 11235-11240 (1982).

- [25] C.D. Rillahan and J.C. Paulson: Glycan microarrays for decoding the glycome, *Annu. Rev. Biochem.*, 80, 797-823 (2011).
- [26] N. Uchiyama, A. Kuno, H. Tateno, Y. Kubo, M. Mizuno, M. Noguchi and J. Hirabayashi: Optimization of evanescent-field fluorescence-assisted lectin microarray for high-sensitivity detection of monovalent oligosaccharides and glycoproteins, *Proteomics*, 8 (15), 3042-3050 (2008).
- [27] 久野敦, 武石俊作, 平林淳: レクチンマイクロアレイのタンパク質医薬品生産プロセス開発への応用, *バイオ医薬品開発における糖鎖技術* (早川堯夫, 掛樋一晃, 平林淳 監修) シーエムシー出版, 230-241 (2011).
- [28] J. Hirabayashi, M. Yamada, A. Kuno and H. Tateno: Lectin microarrays: concept, principle and applications, *Chem. Soc. Rev.*, 42 (10), 4443-4458 (2013).
- [29] A. Kuno, Y. Itakura, M. Toyoda, Y. Takahashi, M. Yamada, A. Umezawa and J. Hirabayashi: Development of a data-mining system for differential profiling of cell glycoproteins based on lectin microarray, *J. Proteomics Bioinformatics*, 1(2), 68-72 (2008).
- [30] M. Toyoda, M. Yamazaki-Inoue, Y. Itakura, A. Kuno, T. Ogawa, M. Yamada, H. Akutsu, Y. Takahashi, S. Kanzaki, H. Narimatsu, J. Hirabayashi and A. Umezawa: Lectin microarray analysis of pluripotent and multipotent stem cells, *Genes Cells.*, 16 (1), 1-11 (2011).
- [31] Y. Itakura, A. Kuno, M. Toyoda, A. Umezawa and J. Hirabayashi: Podocalyxin-targeting comparative glycan profiling reveals difference between human embryonic stem cells and embryonal carcinoma cells, *J. Glycom. Lipidom.*, S5-004 (2013).
- [32] S. Saito, Y. Onuma, Y. Ito, H. Tateno, M. Toyoda, A. Hidenori, K. Nishino, E. Chikazawa, Y. Fukawatase, Y. Miyagawa, H. Okita, N. Kiyokawa, Y. Shimma, A. Umezawa, J. Hirabayashi, K. Horimoto and M. Asashima: Possible linkages between the inner and outer cellular states of human induced pluripotent stem cells, *BMC Syst. Biol.*, 5 Suppl 1, S17 (2011).
- [33] 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).
- [34] K. Hasehira, H. Tateno, Y. Onuma, Y. Ito, M. Asashima and J. Hirabayashi: Structural and quantitative evidence for dynamic glycome shift on production of induced pluripotent stem cells, *Mol. Cell. Proteomics*, 11 (12), 1913-1923 (2012).
- [35] Y. Onuma, H. Tateno, J. Hirabayashi, Y. Ito and M. Asashima: rBC2LCN, a new probe for live cell imaging of human pluripotent stem cells, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 431 (3), 524-529 (2013).
- [36] 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).
- [37] National Research Council: *Transforming Glycoscience*, The National Academies Press (US), (2012).
- [38] N. Taniguchi, T. Suzuki and K. Ohtsubo (eds.): *Sugar Chains*, Springer, Tokyo (2014), in press.
- [39] J. Hirabayashi, A. Kuno and H. Tateno: Lectin-based structural glycomics: a practical approach to complex glycans, *Electrophoresis*, 32 (10), 1118-1128 (2011).

[40] 平林淳: 糖鎖のはなし, 日刊工業新聞 (2008).

[41] 平林淳: 転換期を迎えたバイオ医薬品～成否のカギはオープンイノベーションと糖鎖制御, *MEDCHEM NEWS*, 23 (2), 16-21 (2013).

執筆者略歴

平林 淳(ひらばやし じゅん)

1980年東北大学理学部卒業。1982年東北大学大学院理学修士。1982年帝京大学薬学部助手～講師。1989年東北大学大学院理学博士。2002年(独)産業技術総合研究所糖鎖工学研究センター研究チーム長。2006年同、糖鎖工学研究センター副センター長。2012年同、幹細胞工学研究センター上席研究員(現、首席研究員)。



査読者との議論

議論1 全体的なコメント

コメント(上田 次次:兵庫県立工業技術センター)

この研究の展開には、いくつかの重要な飛躍があったことが伺えます。物語風であるので、そのエピソードが強調されわかりやすくなっていると思います。しかし、それらの飛躍は、単なる偶然ではなく、何らかの仮説に基づいていたはずで、新しい要素技術を仮定したのか、あるいは、既存技術の構成のための仮説を立てたのかなど、明記してください。そうすると、シンセシオロジーの論文として、よりふさわしいものとなります。

また、読者の理解を容易にするために、この論文の構成に沿う流れ図のような説明図を加えるのがいいと思います。物語風の記述とセットになって、読者が論理的に理解しやすくなると思います。

コメント(湯元 昇:産業技術総合研究所)

この研究の目標は「糖鎖プロファイリング技術の開発」であり、「FACによる原理検証」という大きなブレイクスルーを軸に、「レクチンのアレイ化」、「エバネッセント波励起蛍光検出法」といった要素技術を統合してレクチンマイクロアレイを開発しています。しかし、そのシナリオは特にバイオ分野以外の人にとってはわかりにくいものとなっています。その大きな理由は、時系列に沿った記述となっているからと思われる。そこで、まずレクチンマイクロアレイとそれを用いた糖鎖プロファイリングの概念図を入れて頂き、そのもととなる原理の検証が必要であったことと、マイクロアレイの要素技術を統合したという構成にして頂けないでしょうか。

回答(平林 淳)

後半の「応用展開」を除き全編にわたり、ご指摘の点を意識して技術シナリオ、仮説を明示しつつ修正を試みました。本技術の構成・論立てと物語の対応がわかるような図7を最後に加え、かつ技術中心のシナリオとして総括を加えてみました。

しかし、時系列(物語風)の論調をくずすと、その持ち味が失われること(文章力によりませんが)、結局全部を書きなおすことになってしまうと感じます。熟慮の結果、時系列の記載はそのままとし、冒頭に糖鎖解析の難しさをイメージとしてまず植え付けさせ(課題を提示)、本技術であるレクチンマイクロアレイの操作法の従来法との違い(図2)、レクチンアレイの原概念(図3)⇒ブレイクスルーとなったFACの改良(図4)、そしてPJで得たデータ(図5)=レクチンアレイのイメージそのもの)という流れを明確に提示しました。さらに、最後に技術が中心のシナリオになるよう、読者にレビューしてもらおうべく、総括を加えてみました。

議論2 糖鎖の構造解析の困難性の明示

コメント(上田 次次)

糖鎖が、構造的多様性と時間的不安定性が大きく、複雑であることが、この研究の出発点として強調されています。糖鎖が核酸やタンパク

質に比べて数値的にどの程度違うのかを例示すると、読者にはわかりやすいのではないのでしょうか。

コメント (湯元 昇)

最初のところで、糖鎖プロファイリングがなぜ重要かが分野外の読者にもわかるよう記述して頂けないでしょうか。糖鎖の代表的化学構造なども入れられて、その複雑性がわかるような工夫、さまざまな糖鎖を認識するレクチンが存在することがわかるような工夫も入れて頂ければと思います。

回答 (平林 淳)

糖鎖の構造解析が他の高分子と比してなぜ困難なのかを、糖タンパク質の模式図と構造が複雑になる要素を階層性の視点を入れ説明する図1を新たに作成してみました。これによって糖鎖を切り出して相互分離する従来法と、レクチンアレイによる解析アプローチの違いを示した図2が旧稿より理解しやすくなったのではと思います。

議論3 開発したシステムの優位性

コメント (湯元 昇)

「エバネッセント波励起蛍光検出法」のところで、著者らの開発したシステムの優位性が良く理解できないものとなっています。「検出感度の高さ」が優位性としてあげられていますが、この特徴がどこから出てきているのかがわかりません。本文の最後のところで、『理論上「エバネッセント=高感度」ではないが』とありますので、高感度化がなぜ達成できたのかは説明できていないのかもしれませんが、少し説明的記述をお願いできないでしょうか。

回答 (平林 淳)

高感度の達成にはエバネッセント波励起原理の採用だけでなく、光学系、生化学系、ソフト系それぞれにおけるバックグラウンド低減の諸策が貢献した点を追記しました。