

# セルロース磁性ビーズを用いる 自動化適用の糖ペプチド調製法 (自動化に適した糖ペプチド試料の製造)

新技術説明会  
2025年10月7日

岐阜大学 糖鎖生命コア研究所  
准教授 中嶋和紀

## 【発明1】

発明の名称 : 糖ペプチド試料の製造方法

発明者 : 中嶋 和紀、半澤 健

出願人 : 国立大学法人東海国立大学機構[100%]

出願番号 : PCT/JP2025/ 688 (2025-1-10出願/優先日 2024-1-12)

新規性喪失の例外規定の適用 : 有り

## 【発明2】

発明の名称 : エンドグリコシダーゼ抵抗性を利用した  
高深度グライコプロテオミクス

発明者 : 中嶋 和紀、半澤 健、ネムチッチ マティ

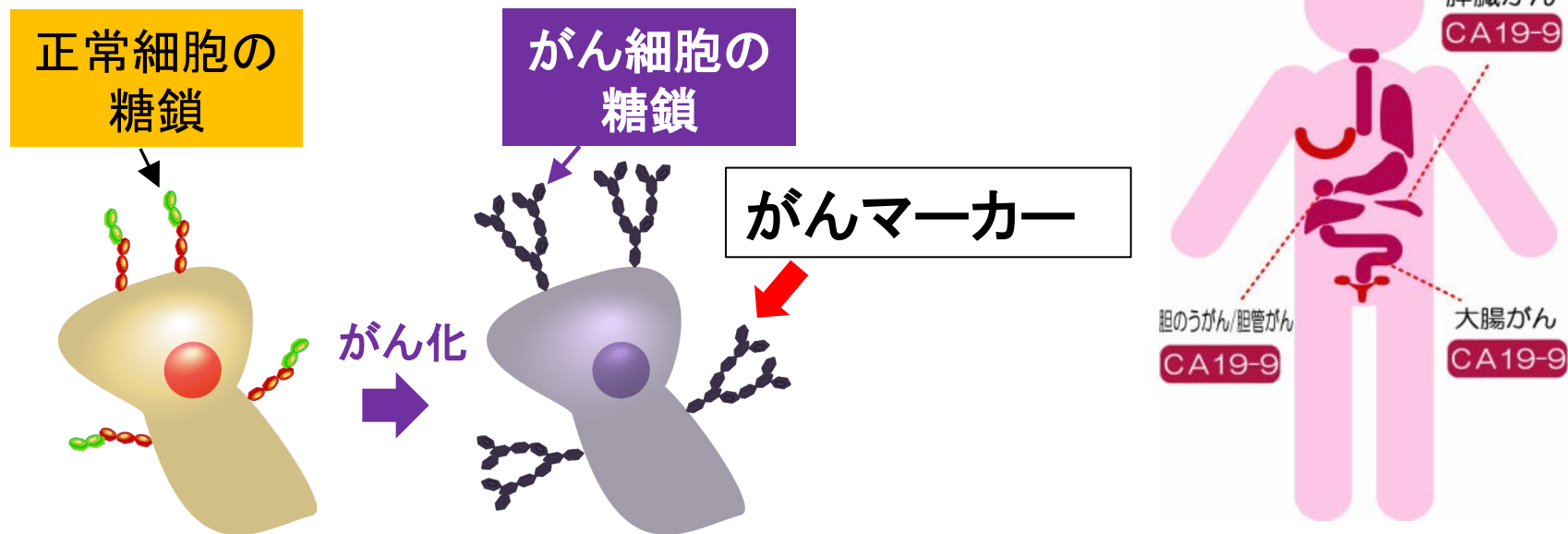
出願人 : 国立大学法人東海国立大学機構[100%]

出願番号 : 特願2025-140017 (2025-8-27 出願)

新規性喪失の例外規定の適用 : 無し

# 発明の背景①

## 糖鎖変化はがんマーカーにもなる



CA19-9

膵臓がんマーカー  
糖鎖を利用した**診断**

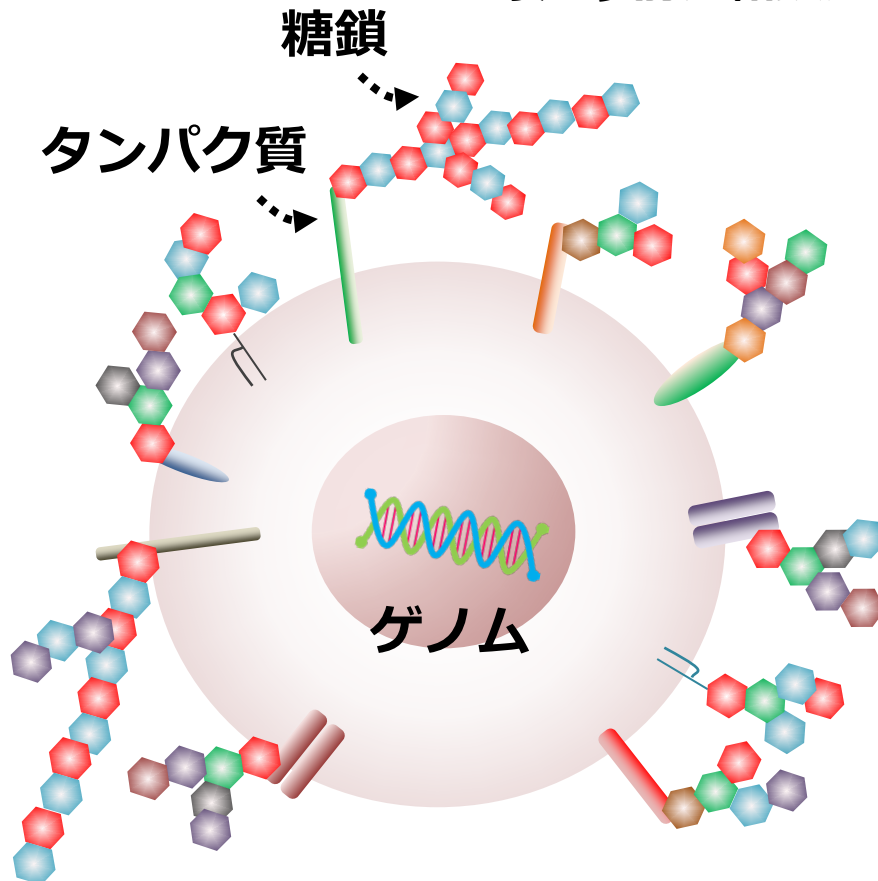
# 発明の背景②

## ヒューマングリコームプロジェクト(HGA)の稼働

文部科学省 大規模研究フロンティア促進事業

ゲノム・タンパク質・糖鎖

この3大生命鎖の情報量を同等にまで押し上げる  
～あたり前に糖鎖が研究に使われる時代に～



情報量

ゲノム

タンパク質

糖鎖

生命科学革新  
医療革新

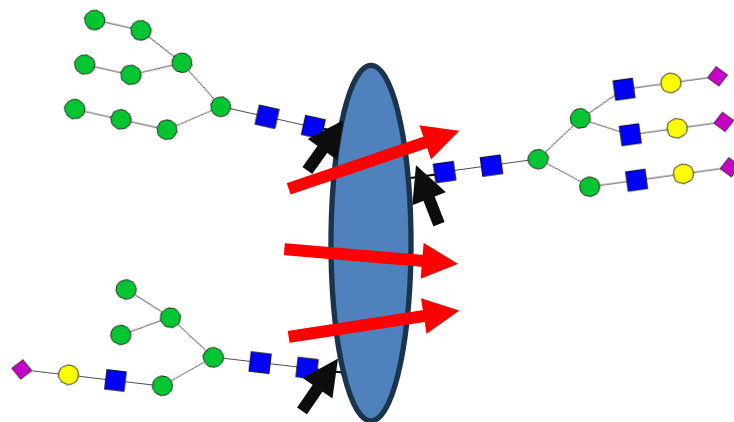
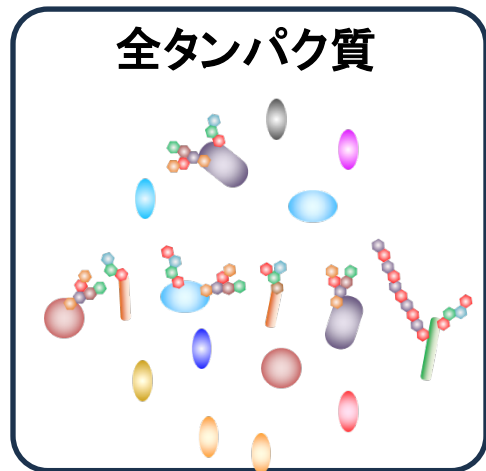
押し上げ

2023

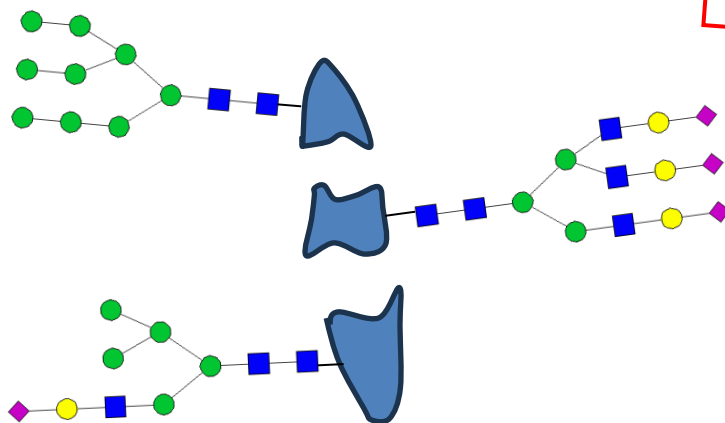
2033

新技術説明会  
New Technology Presentation Meetings!

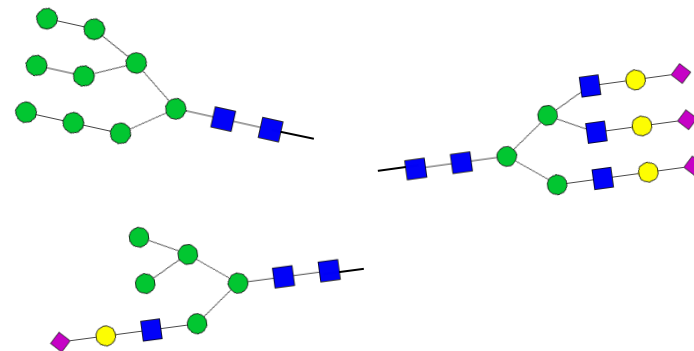
# 発明の背景③



グライコプロテオミクス



グライコムクス



糖鎖配列とペプチド配列の情報を  
両者同時に解析できる技術

# 発明の概要

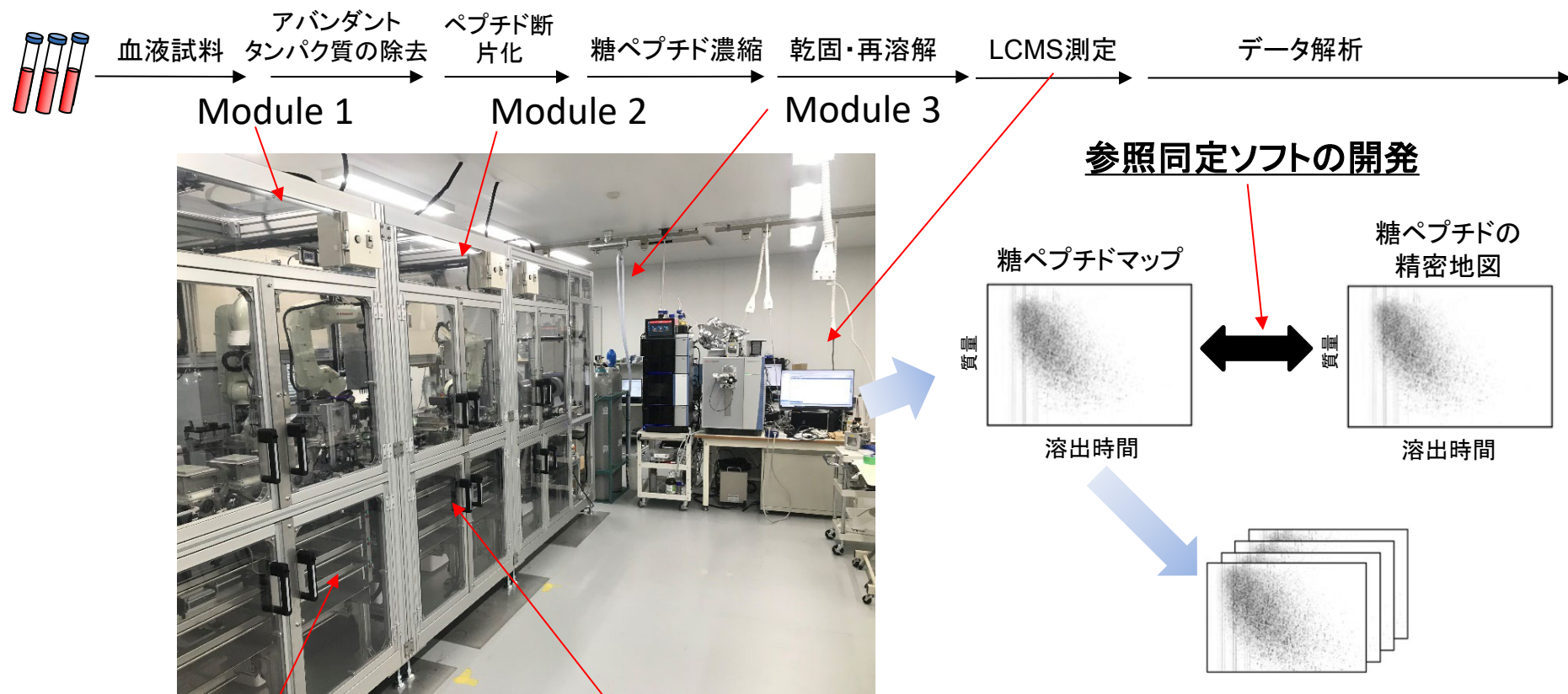
本発明は、糖ペプチドの調製方法に関するものである。これまでのグライコプロテオミクスで用いられる調製方法は、実験作業は途切れ途切れに半自動で行うものであり、22万検体の多検体測定を可能にする全自動装置の開発には適していなかった。また、微量糖ペプチドの解析に制約があった。

【発明1】PCT/JP2025/ 688 では、磁性粒子を用いるプロテオミクス前処理法(SP3法)を土台に、セルロースビーズとイオンペア剤を用いる糖ペプチド精製法を組み合わせた一気通貫型の前処理を確立した。この技術はグライコプロテオミクスの世界標準法の礎となるものであり、大規模解析を可能にするという大きな特徴をもつ。

【発明2】特願2025-140017では、エンドグリコシダーゼという糖鎖切断酵素により高含量な糖ペプチドを除去した後、さらにPCT/JP2025/ 688の技術により微量糖ペプチドを濃縮する前処理を確立した。この技術は疾患バイオマーカーの高深度探索に有用であり、糖鎖診断装置の開発につながる発明である。

# 発明の背景④

## 22万検体の測定を可能にする自動化装置を開発中



### 新しいパーツの開発

カラムホルダー



自動機対応の減圧遠心機

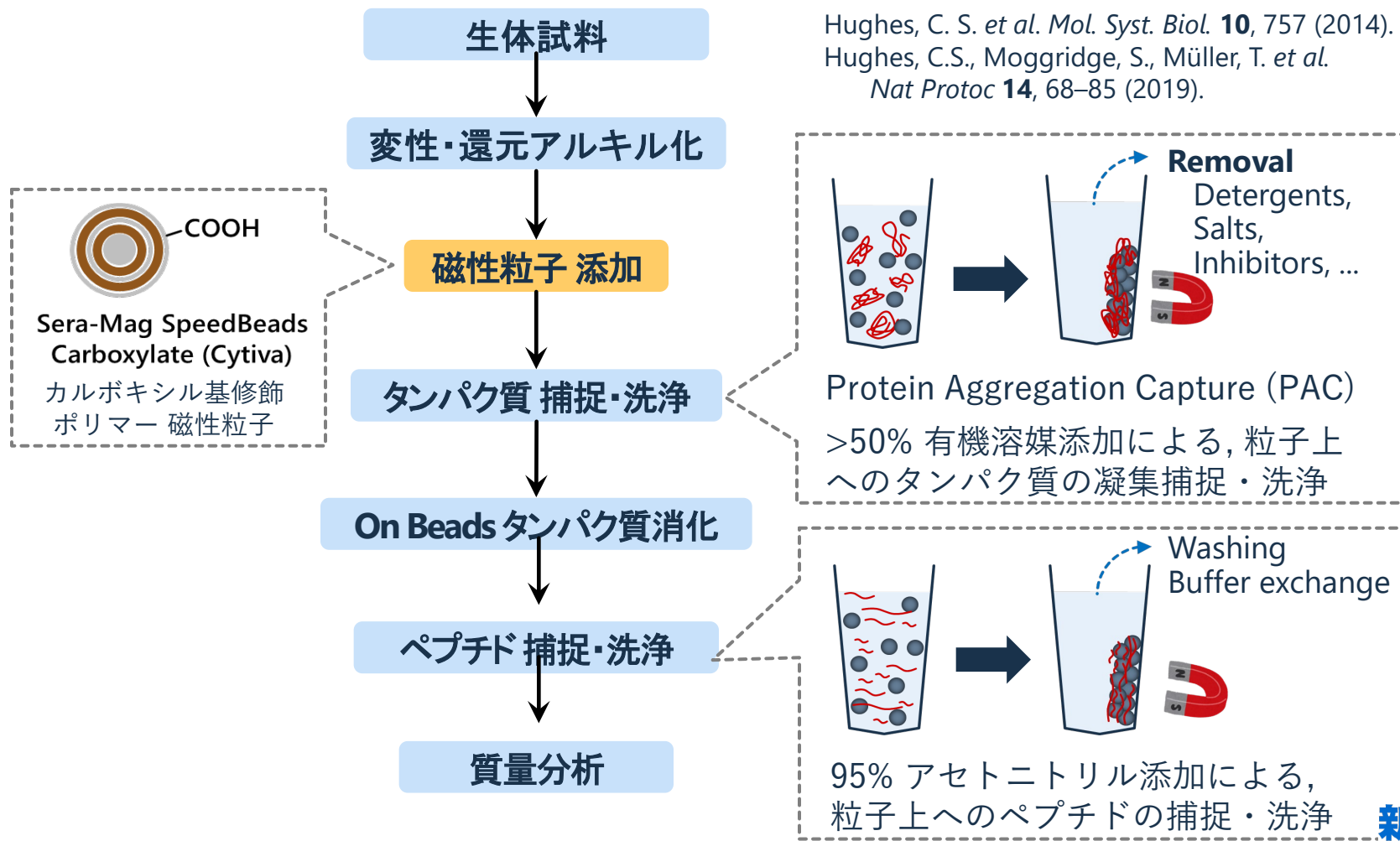


### 本発明 糖ペプチドの製造方法

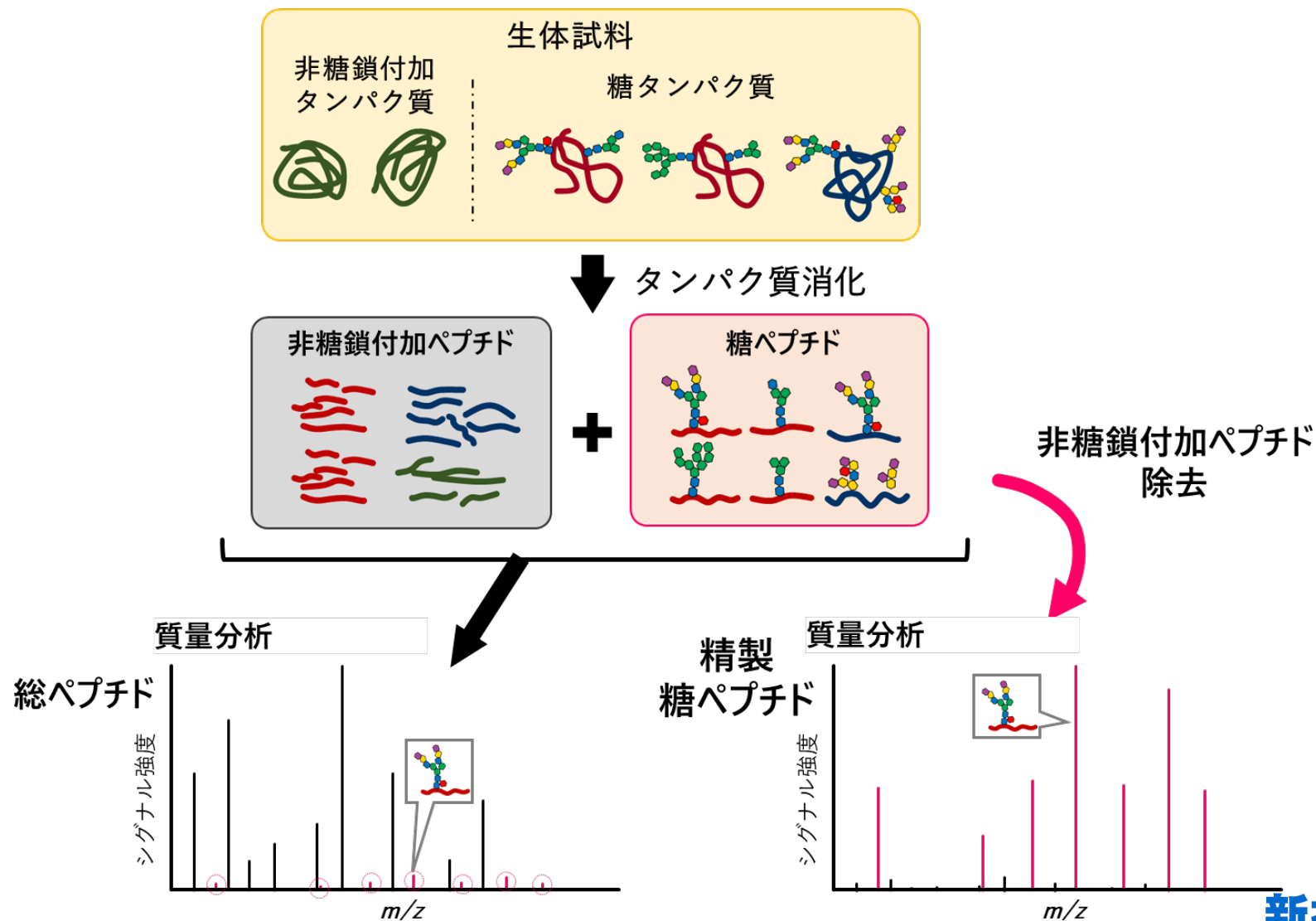
# 発明の背景⑤

## 磁性粒子への試料捕捉を利用した シングルポットプロテオミクス試料調製

Single-pot, solid-phase-enhanced sample preparation (SP3)

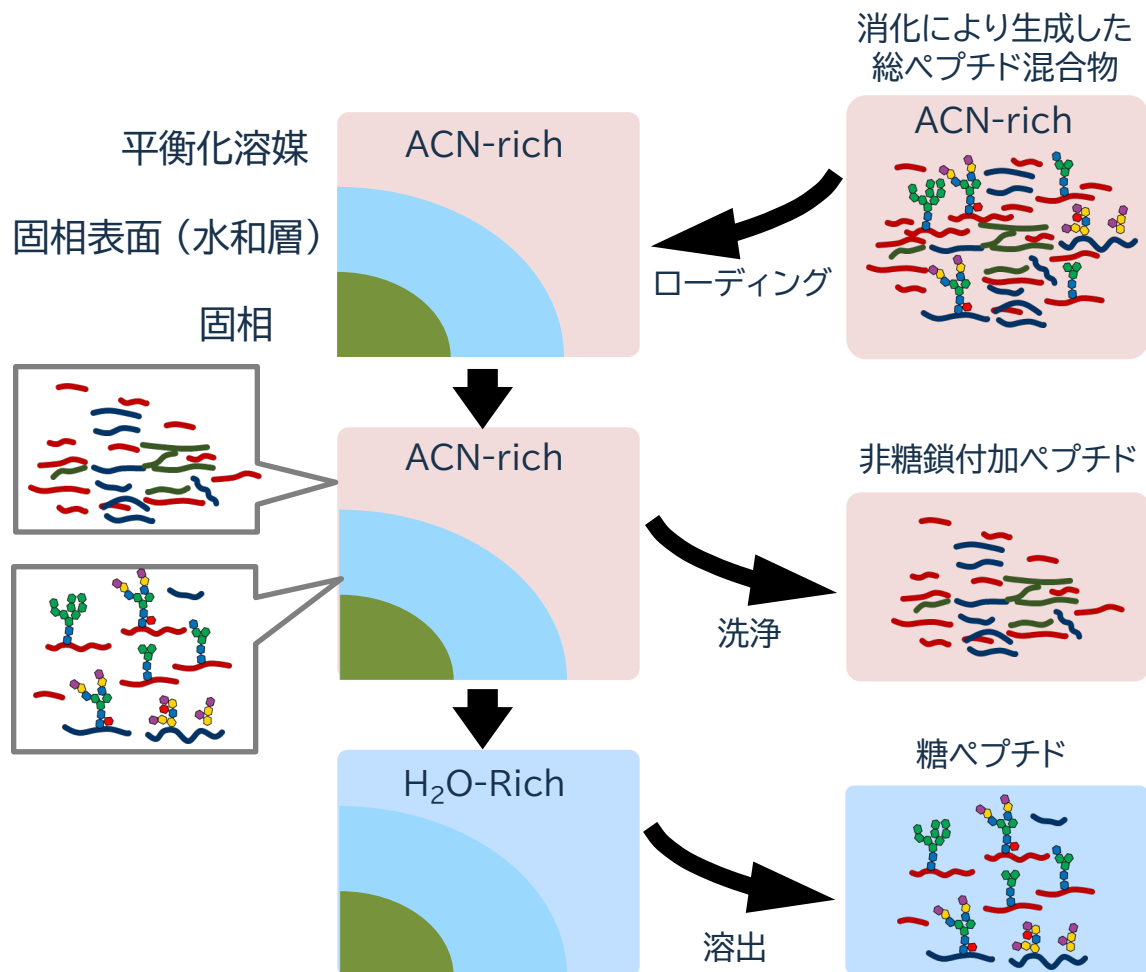


## 糖ペプチド濃縮の必要性



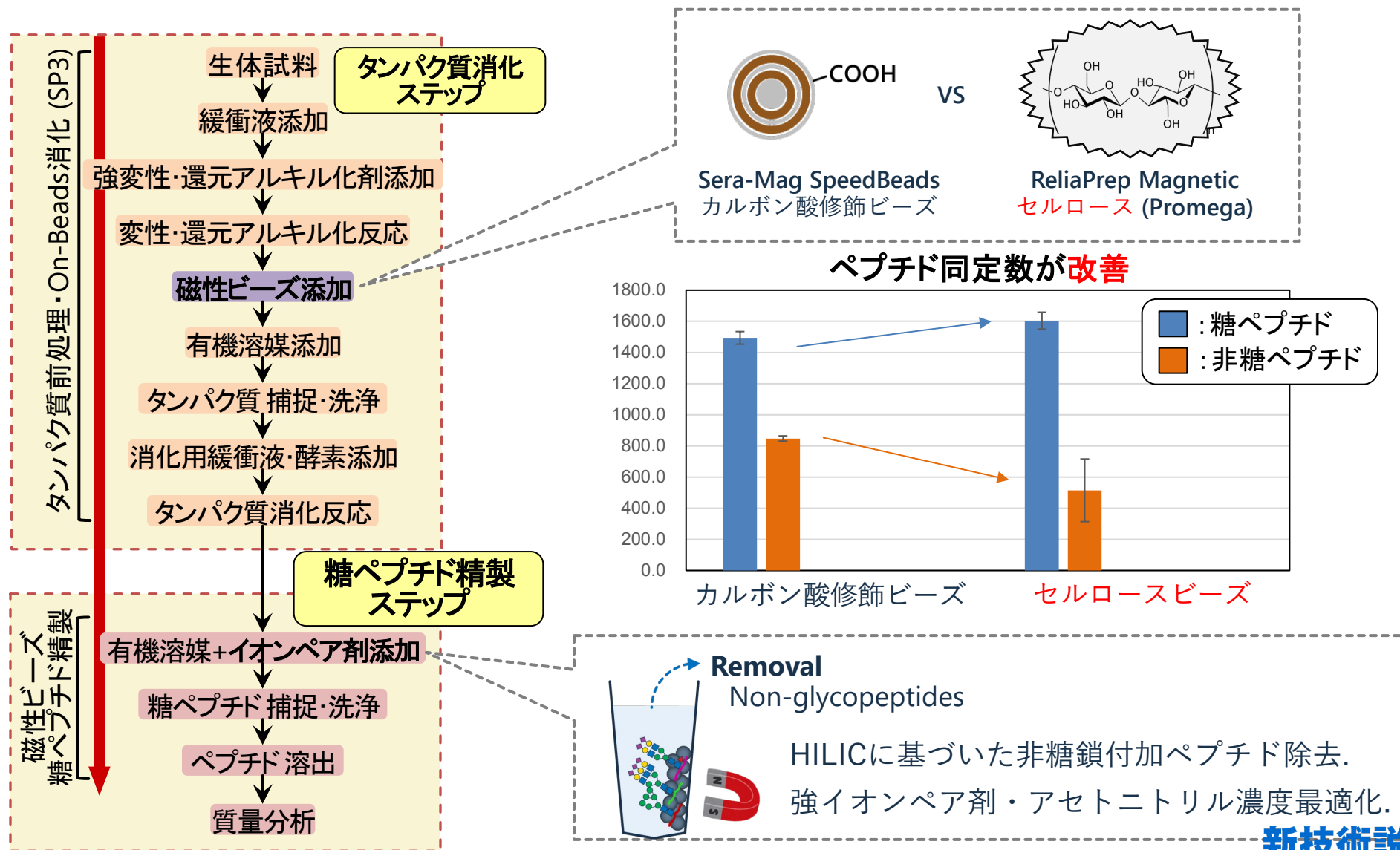
## HILICによる糖ペプチド濃縮

HILIC: Hydrophilic Interaction Liquid Chromatography



# 【発明 1】の技術内容①

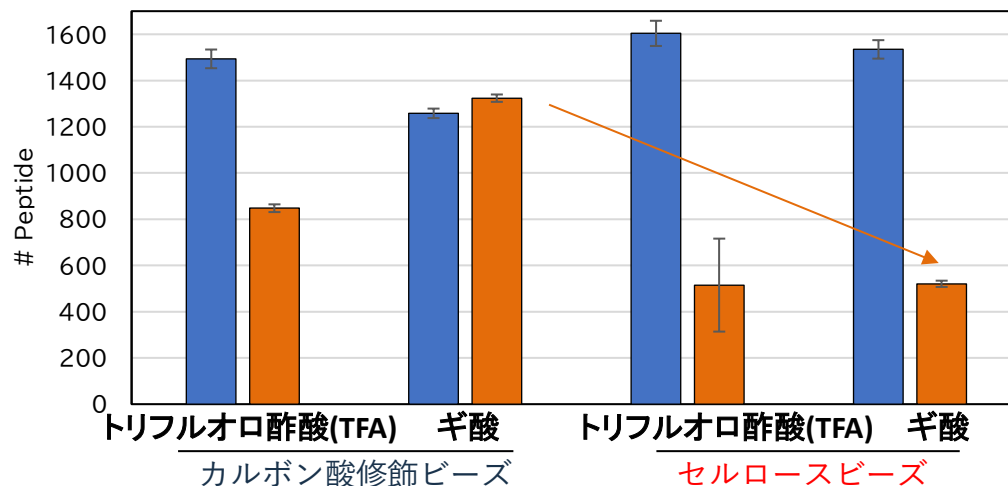
## グライコプロテオミクス前処理の自動化メソッドにてセルロースビーズの採用



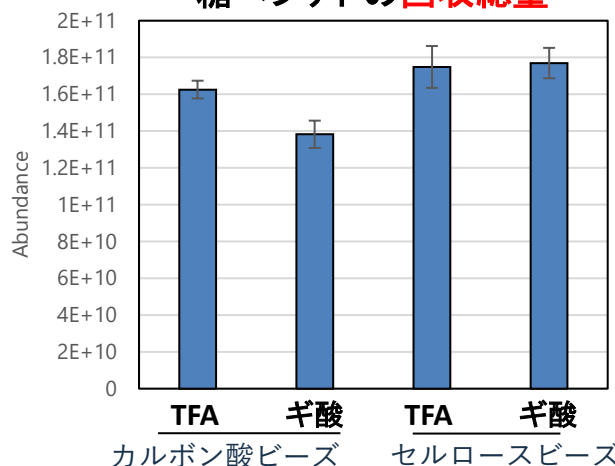
# 【発明 1】の技術内容②

セルロースビーズの採用により、**ギ酸条件(弱イオンペア剤:低性能)**でも  
高純度な糖ペプチド製造が可能

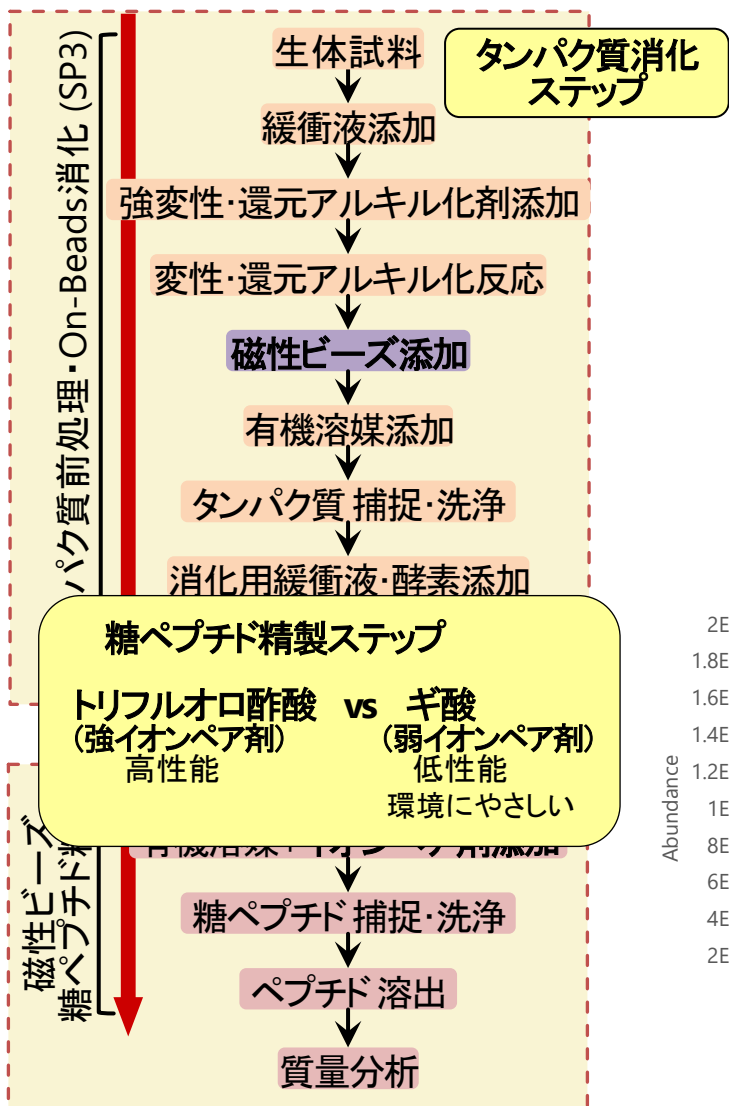
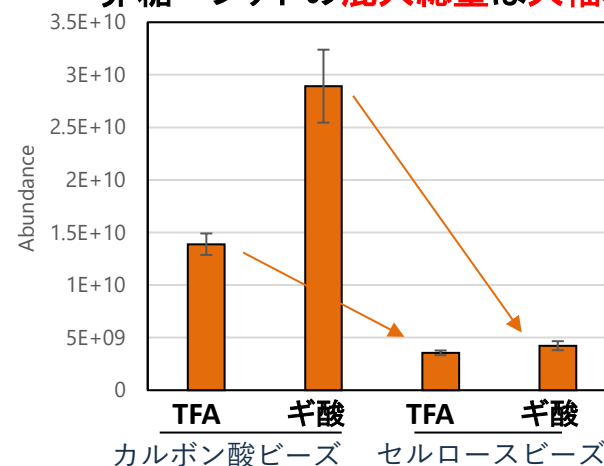
ペプチド同定数が改善



糖ペプチドの**回収総量**



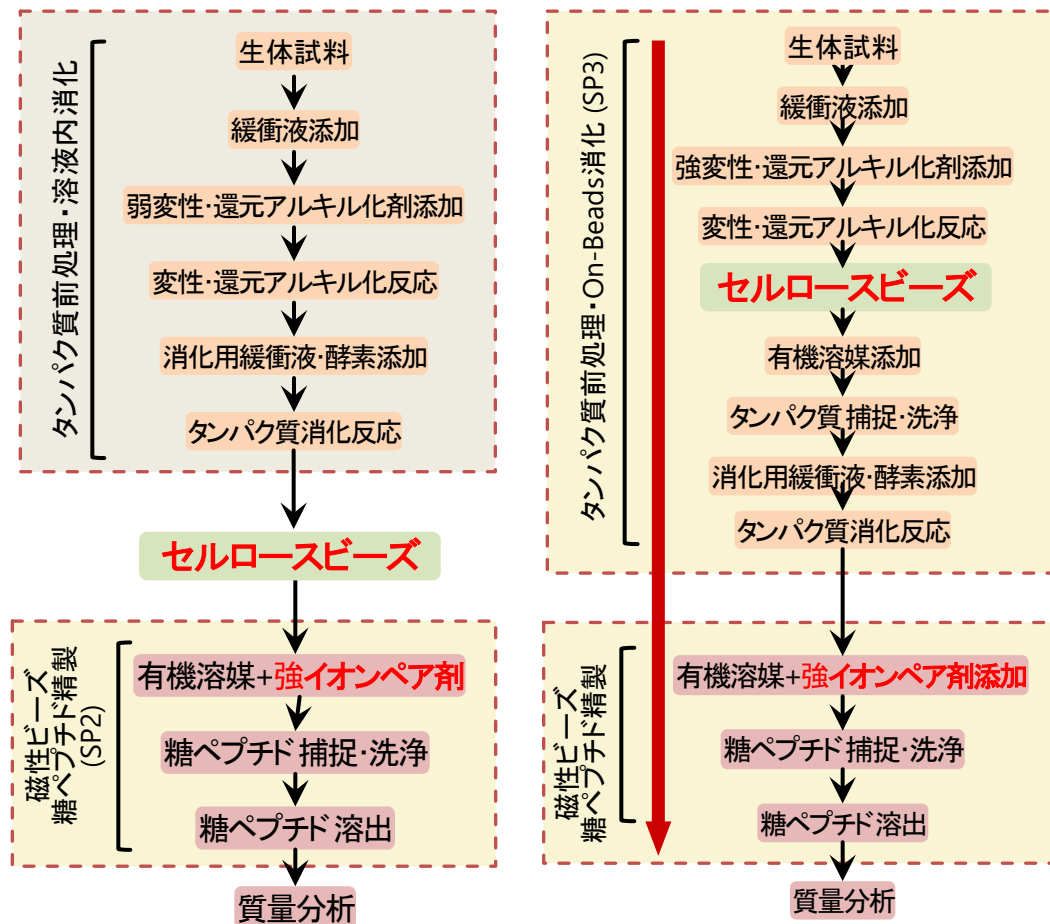
非糖ペプチドの**混入総量は大幅軽減**



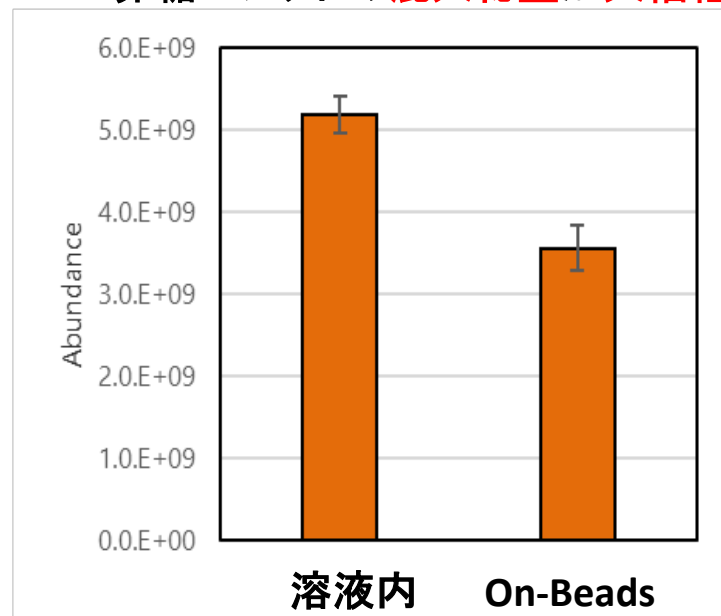
# 【発明 1】の技術内容③

さらに、自動化対応の一連の前処理において、  
高純度な糖ペプチド製造(非糖ペプチドの混入量軽減)が可能になった

## 磁性ビーズを用いた 自動化対応の前処理法

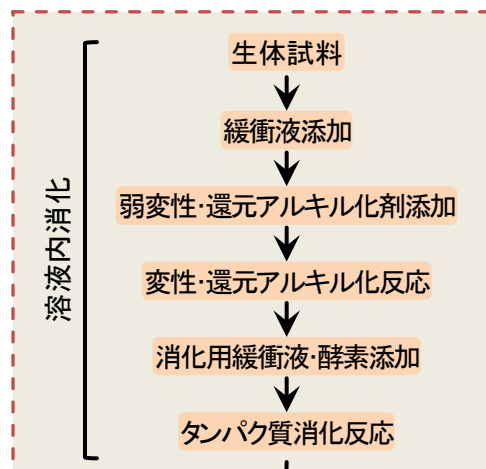


非糖ペプチドの混入総量が大幅軽減



# 有力な競合技術

- ① セルロース担体や  
② 双性イオン担体を用いた  
糖ペプチド精製技術



有機溶媒+弱あるいは強イオンペア剤 ②

①

セルロース樹脂  
カラム

糖ペプチド 捕捉・洗浄

糖ペプチド 溶出

セルロース  
磁性ビーズ

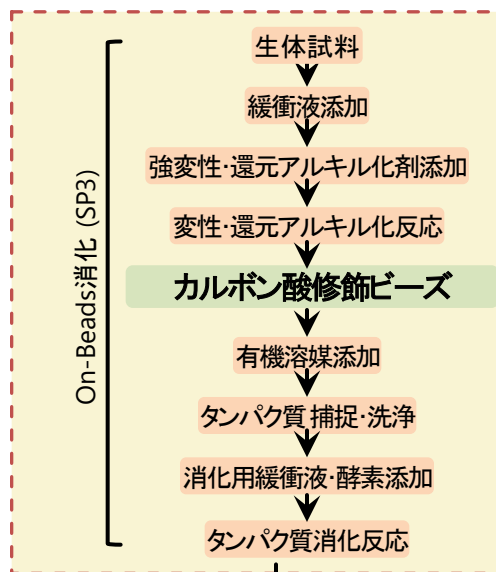
糖ペプチド 捕捉・洗浄

糖ペプチド 溶出

TAKARA Bio, CAT: 4403  
Cellulose Cartridge  
Glycan Preparation Kit,  
販売停止

- ① Selman et al. *Anal.Chem*, 2011.  
② Wu et al. *Anal Chim Acta*, 2020.

- ② SP3法の  
グライコプロテオミクス適用例  
(高深度版)



有機溶媒+強イオンペア剤

双性イオン修飾カラム、磁性ビーズ

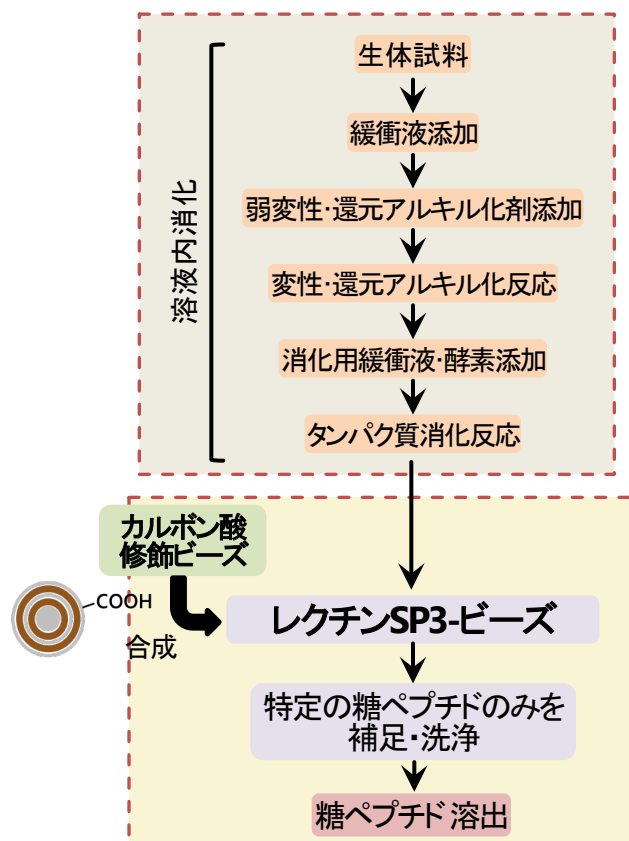
定量用に標識

糖ペプチド 分画

試料1 試料2 試料3 試料4 試料5

- ③ Fang et al. *Nat.Commun*, 2020.

- ③ レクチン-SP3法の  
グライコプロテオミクス適用例  
標的指向型



- ④ Huo et al. *J. Proteome Res*, 2024.

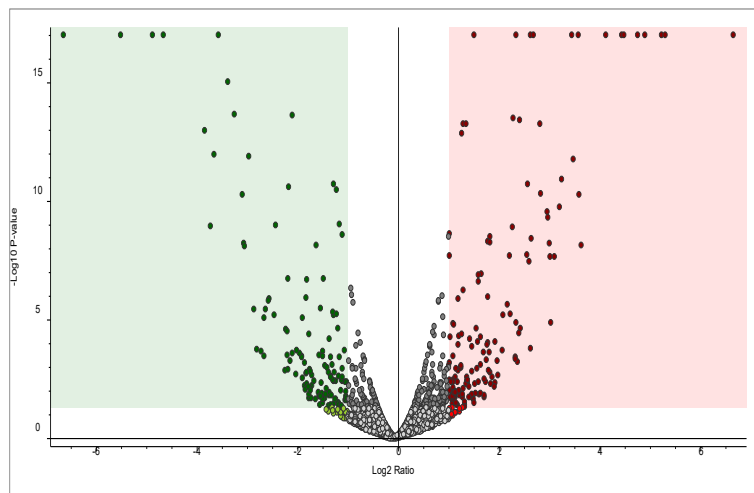
# 【発明 1】の優位性 比較表

|       | 本発明             | 競合技術1     | 競合技術2     | 競合技術3                | 競合技術4             |
|-------|-----------------|-----------|-----------|----------------------|-------------------|
| 構成    | セルロースビーズ        | セルロース担体   | 双性イオンビーズ  | カルボン酸ビーズ             | レクチン磁性ビーズ         |
|       | 糖ペプチド精製にSP3法を融合 | 糖ペプチド精製のみ | 糖ペプチド精製のみ | SP3法のみ               | 糖ペプチド精製のみ         |
| 自動化適用 | 一気通貫型プロトコル      | 非適合       | 非適合       | 一部自動化<br>(煩雑な手作業を含む) | 一部自動化             |
| 処理能力  | 20万検体適用         | 数百検体以下    | 数百検体以下    | 数十検体                 | 数百検体以下            |
| 網羅性   | 高               | 高         | 高         | 特に高深度                | 低（標的型）            |
| コスト   | 安価（市販品）         | 安価        | 高価        | 安価                   | レクチンビーズは高価、保存性が低い |

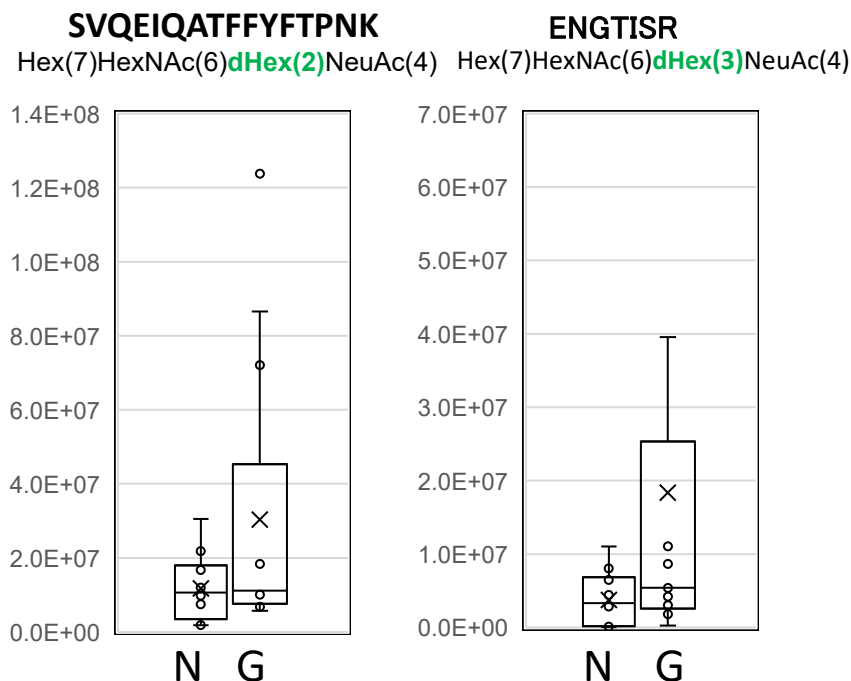
# 【発明 1】の想定される用途

## 血清グライコプロテオミクスによる糖ペプチドの癌性変化解析

健常人(n=10) versus 胃癌患者(n=10)



大阪国際癌センター 宮本泰豪先生との共同研究

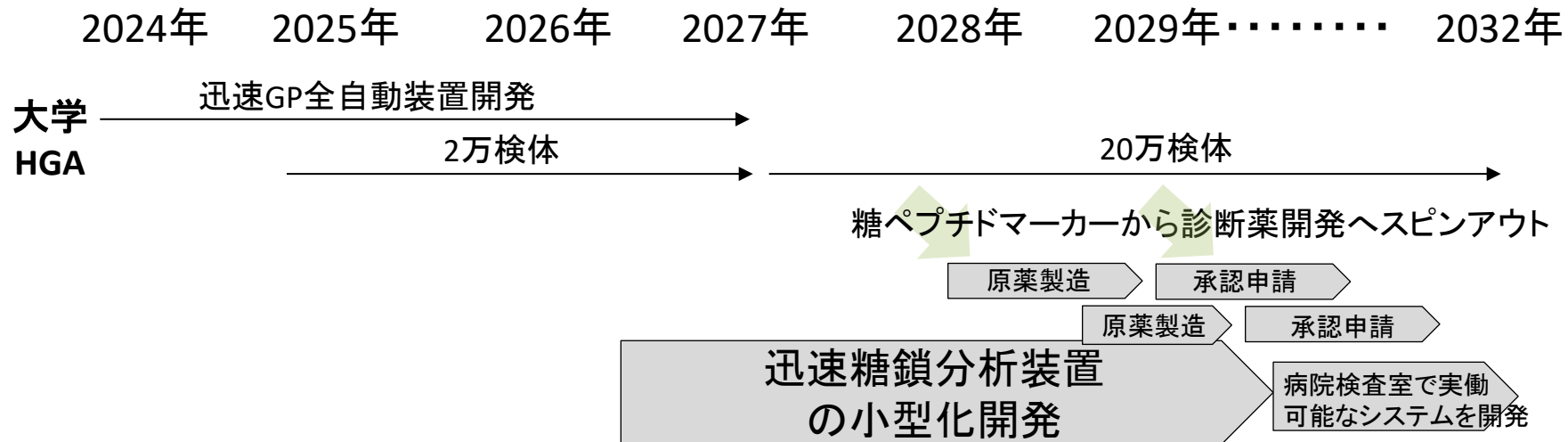


胃癌患者において  
 $\alpha$ 1-酸性糖タンパク質上のフコシル化糖鎖が  
既報どおりに増加した

Yazawa. S et al. *Plos One*, 2016.

# 実用化に向けた今後の対応計画

- ・岐阜大学/東海国立大学機構では、文部科学省 大規模研究フロンティア促進事業(2023-2032年)「**ヒューマングライコムプロジェクト(HGA)**」において、世界標準法の確立、迅速グライコプロテオミクス全自動装置の開発、疾患糖鎖と関連性解明にむけた研究を進めている。
- ・HGAでは22万検体の糖鎖分析を計画しており、本発明はその**根幹をなす前処理技術**である。HGAではアウトプットされる糖鎖マーカークを広く活用するため、**企業コンソーシアムを設置**し、産学連携の体制を整えている。

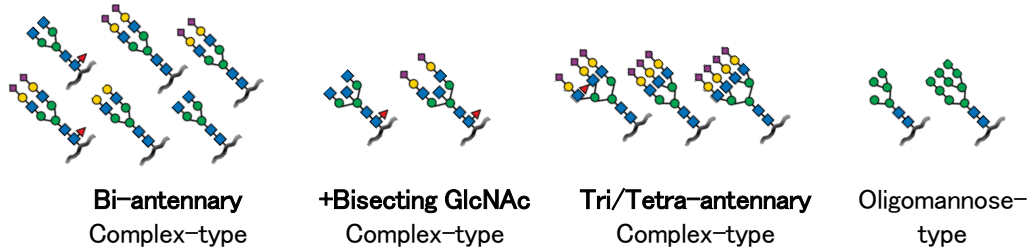


# 【発明2】の背景①

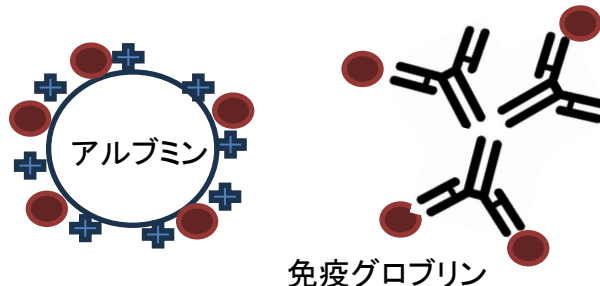
## グライコプロテオミクスで用いられる濃縮技術

### (1) 糖ペプチド vs 非糖ペプチド

・セルロースビーズによる糖ペプチド精製【発明1】



### (2) Top 14-高含量糖タンパク質の除去 - 血清プロテオミクス研究でよく使用される技術 -

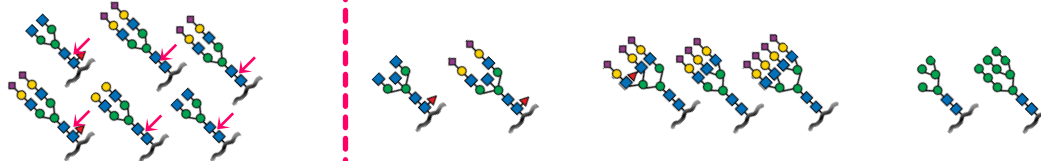


| Top14 columns        |                                |
|----------------------|--------------------------------|
| • Albumin            | • $\alpha$ 1-Acid glycoprotein |
| • IgG                | • Fibrinogen                   |
| • IgA                | • Haptoglobin                  |
| • IgM                | • $\alpha$ 1-Antitrypsin       |
| • IgD                | • $\alpha$ 2-Macroglobulin     |
| • IgE                | • Transferrin                  |
| • IgG (light chains) | • Apolipoprotein A-I           |

### (3) 主要な糖ペプチド vs 特定の糖鎖部分構造を有する低含量な糖ペプチド(癌特異的糖鎖など)

・エンドグリコシダーゼ (例としてEndo F2)消化【発明2】

Endo F2消化による除去



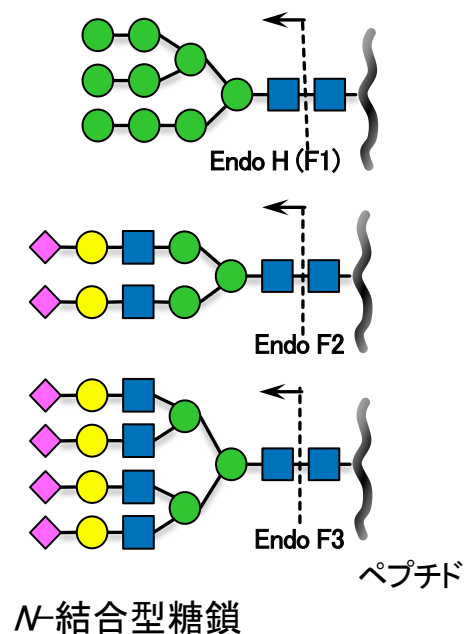
## 【発明2】の背景②

### Endo-*N*-acetylglucosaminidase (ENGase)

- ・ *N*-結合型糖鎖を根元のGlcNAcの間に切断するエンドグリコシダーゼ
- ・ 特定の構造を持つ糖鎖は切断できない（酵素により特異性は異なる）

市販されているENGaseの基質特異性

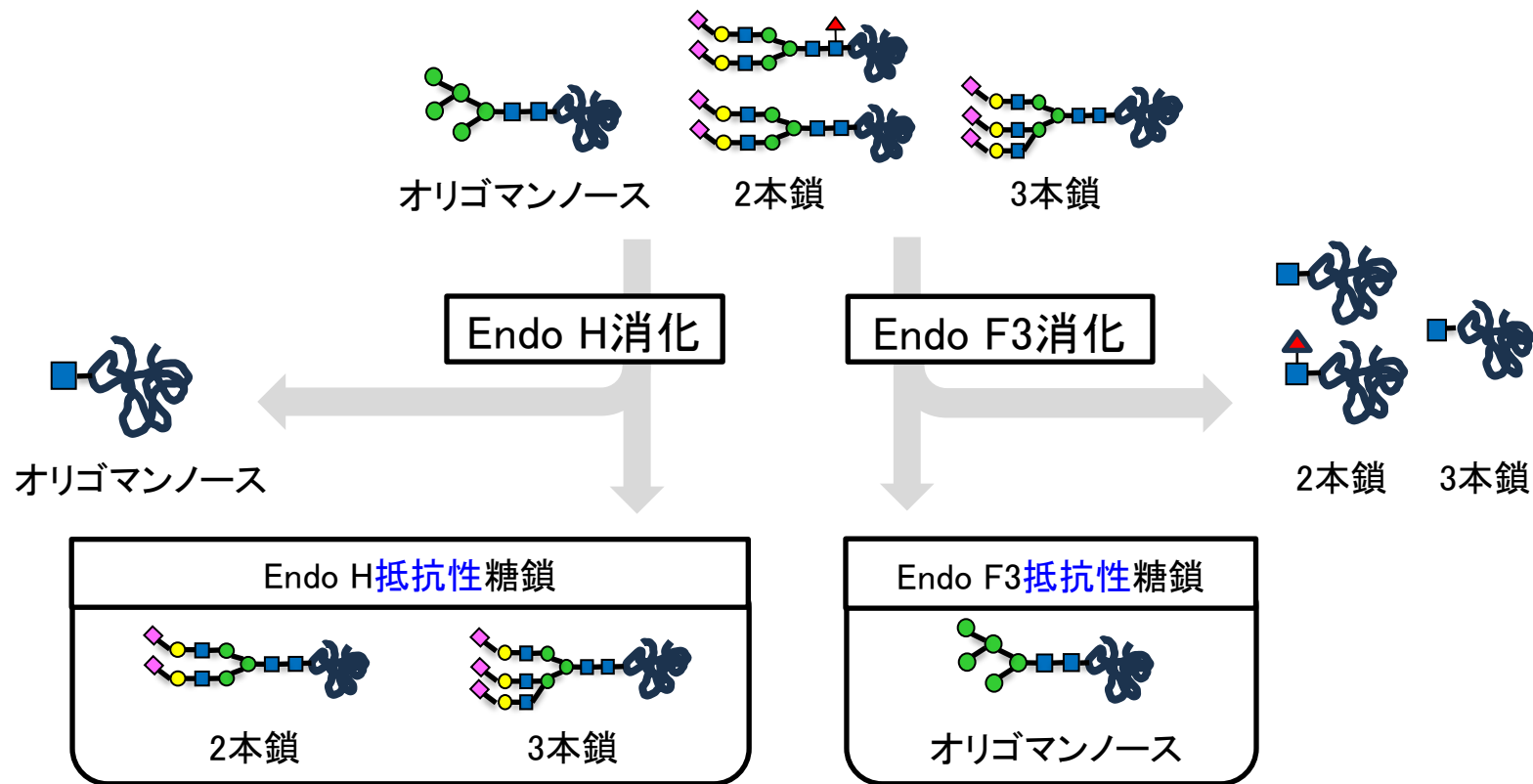
|          |                   |
|----------|-------------------|
| Endo H:  | オリゴマンノース型、ハイブリッド型 |
| Endo F1: | オリゴマンノース型、ハイブリッド型 |
| Endo F2: | 複合型2本鎖            |
| Endo F3: | 複合型2本鎖・3本鎖        |



特定の構造を持つ糖鎖を切断後には、切れ残りが生じる。

# 【発明2】の概要

## エンドグリコシダーゼ(ENGase) 抵抗性糖鎖の解析

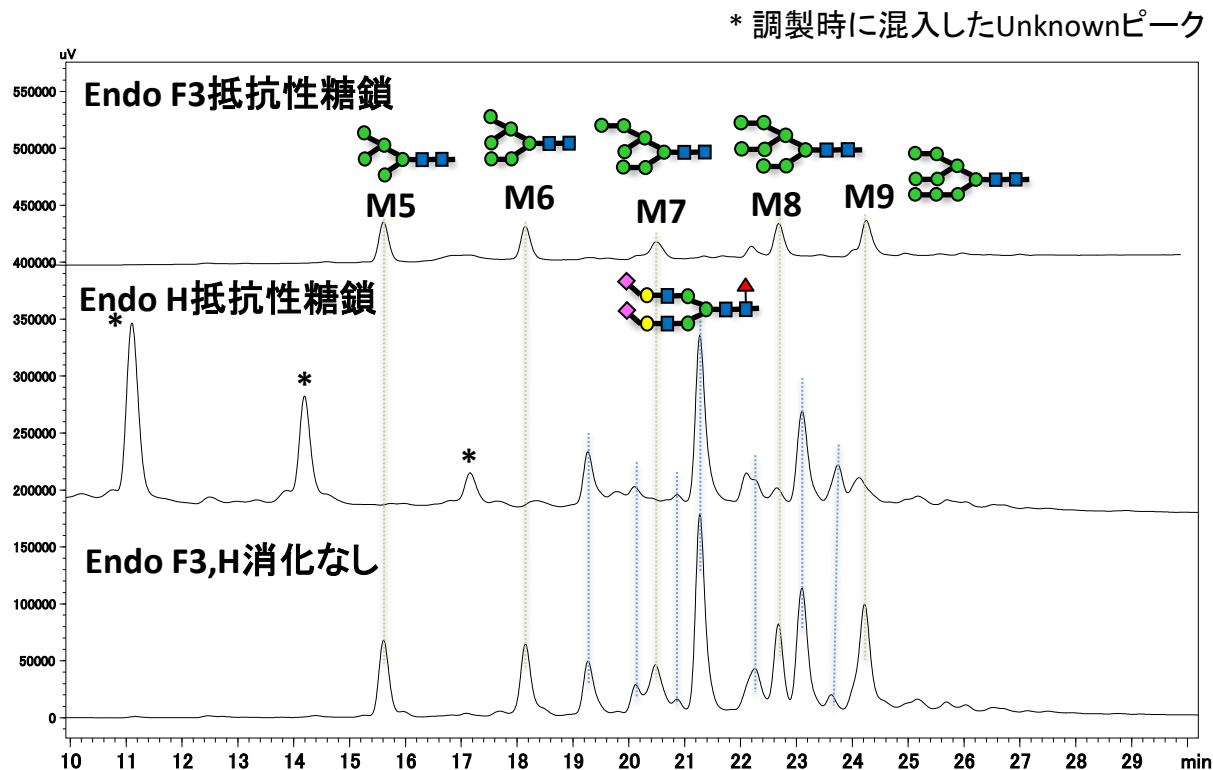
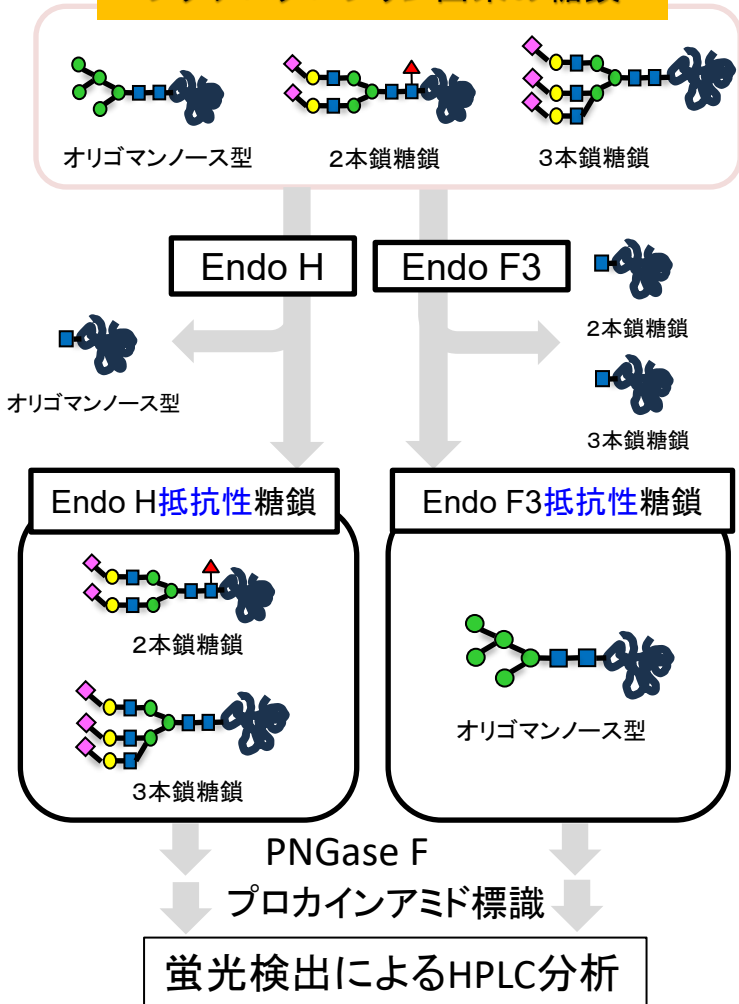


切れ残った糖鎖(糖ペプチド)を解析する技術

# 【発明 2】の技術内容①

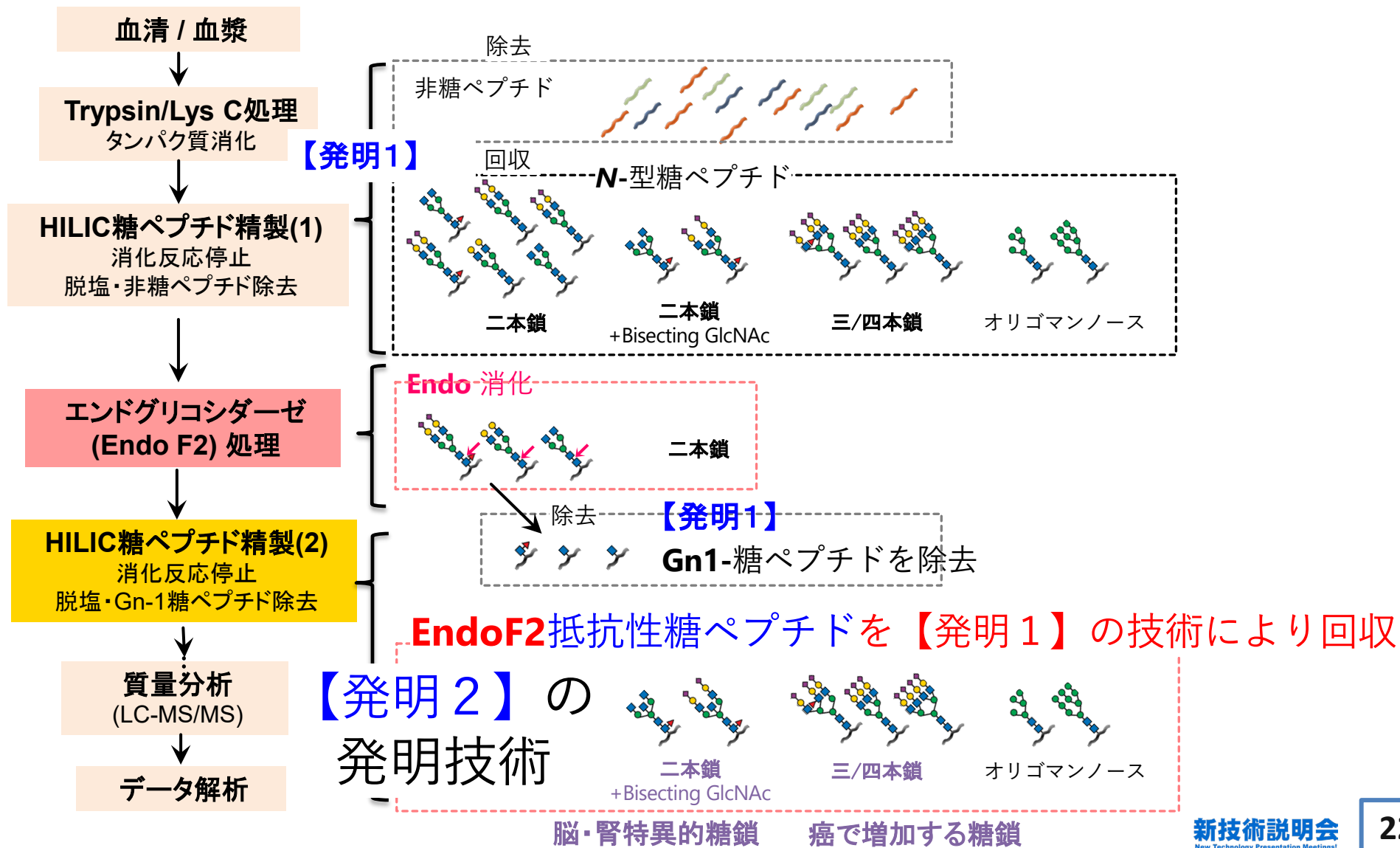
## 標準試料の糖鎖解析に基づく抵抗性糖鎖の解析例

### ブタチログロブリン由来の糖鎖



# 【発明2】の技術内容②

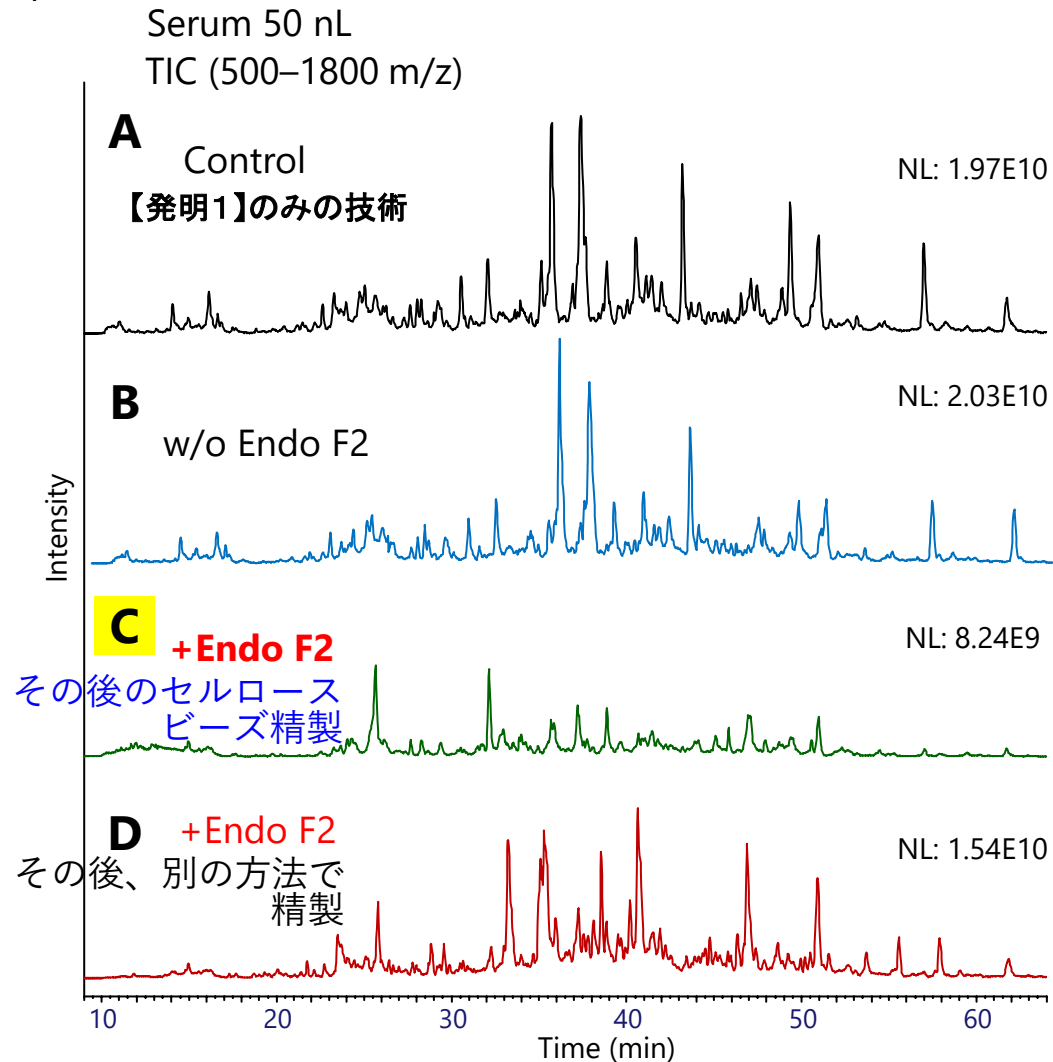
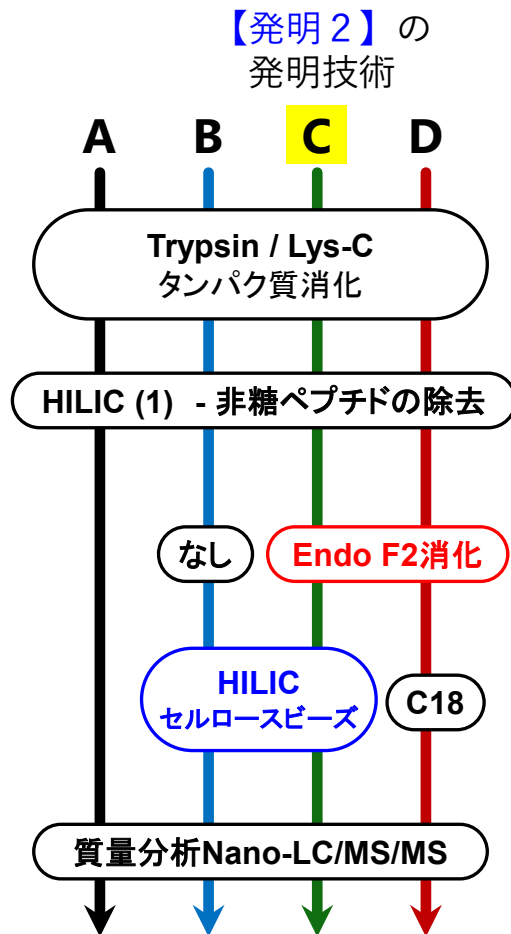
## 血清試料に含まれる主要な二本鎖糖ペプチドの除去技術



# 【発明2】の技術内容③

## 血清グライコпротеオミクスにおける本技術の効果

・試料: アルブミンとIgGを除去した血清試料(10  $\mu$ L)

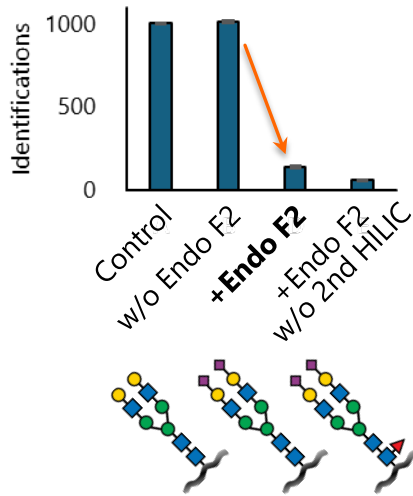


# 【発明2】の技術内容④

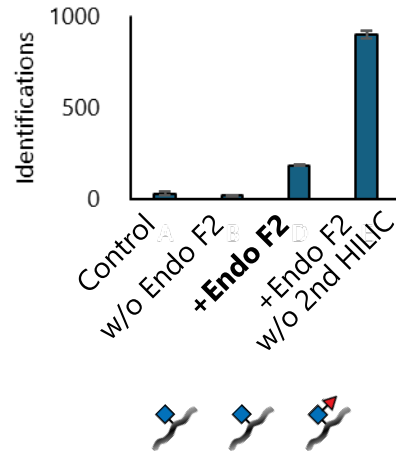
## 脳・腎特異的糖鎖や癌で増加する糖鎖群を多く検出

50nL（血清相当量を注入）

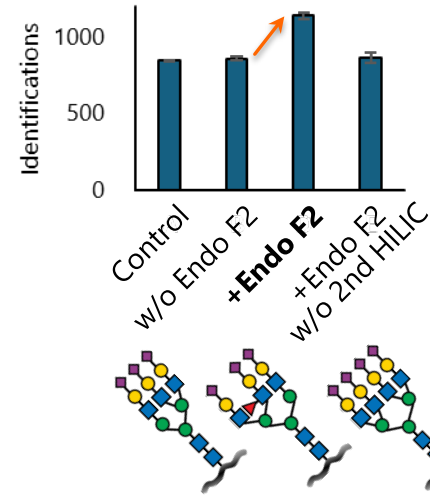
2本鎖付GP (Hex3-5 HexNAc4)



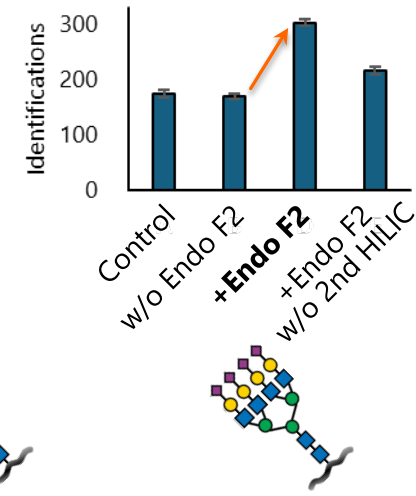
Gn (HexNAc1)



3・4本鎖・バイセクト型GP (HexNAc>5)

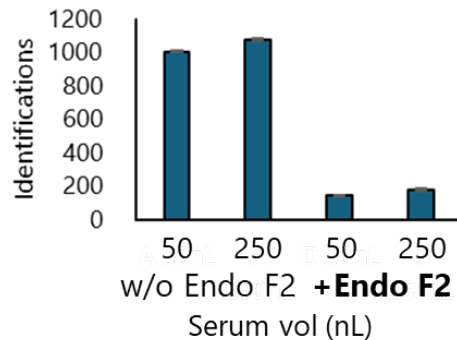


4本鎖付GP (HexNAc>6)

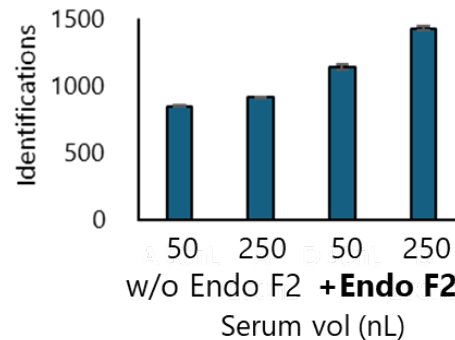


測定注入量を増やした効果 50nL → 250nL（血清相当量）

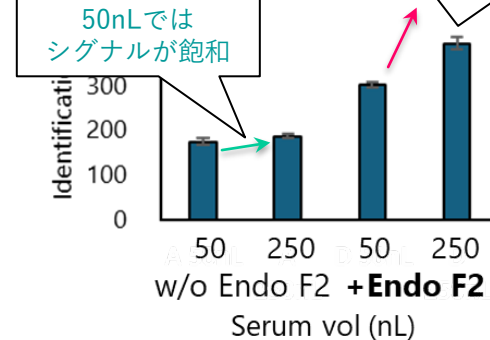
Bi (Hex3-5 HexNAc4)



Tri+Tetra+BiBs (HexNAc>5)



Tetra (HexNAc>6)



注入量を増やすと、より検出効率向上。

50nLではシグナルが飽和

# 新技術のまとめ

## 【発明1】の技術：糖ペプチド試料の製造方法

- 非糖ペプチドを除去する方法
- 磁性粒子を用いるプロテオミクス前処理法(SP3法)を土台に、セルロースビーズとイオンペア剤を用いる糖ペプチド精製法を組み合わせた**一気通貫型の前処理法**

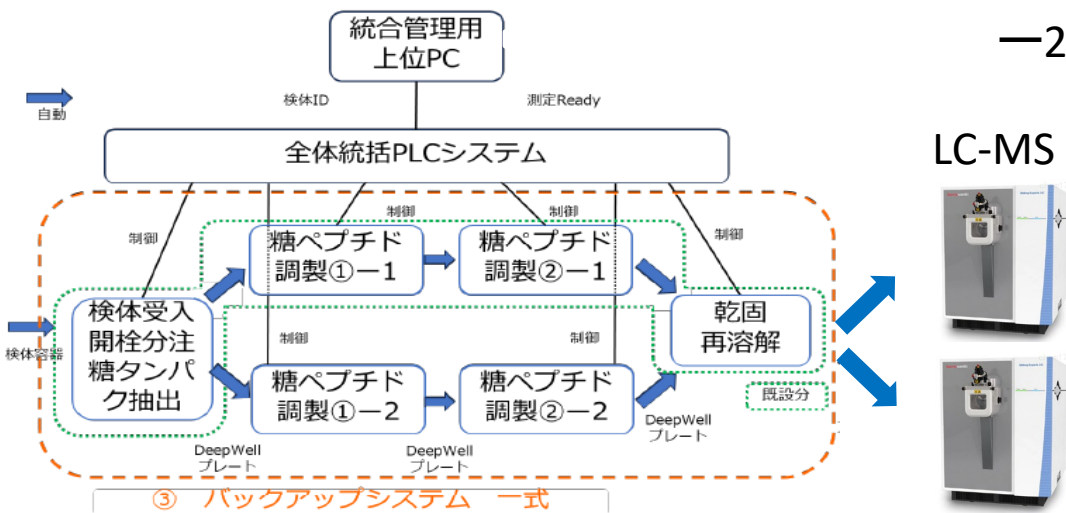
## 【発明2】の技術：エンドグリコシダーゼ抵抗性を利用した 高深度グライコプロテオミクス

- グライコフォーム特異的に糖ペプチドを除去する方法
- エンドグリコシダーゼ消化(例えば Endo F2)により2本鎖糖鎖をもつ糖ペプチドを除去した後、さらに【発明1】の技術を組み合わせて**微量糖ペプチドを濃縮する前処理法**

# 技術移転活動の計画

## 【発明 1】の技術を搭載した**全自動分析装置**（2027年度に完成予定）

—20万検体を5年かけて実施するための装置—

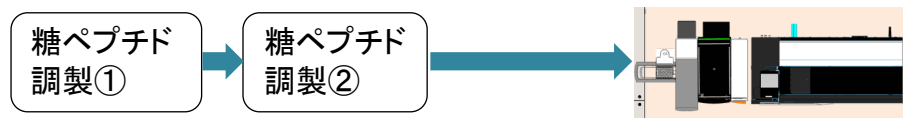


### 処理能力

1日あたり48検体/plateを6枚処理する  
864検体/week（週に3日間稼働）

## 【発明 2】の技術を搭載、さらに小型化開発した**糖鎖診断装置** （2029年度以降の実現を目指す）

標的解析用LC-MS



- 課題**
- ・遠心分離、乾固・再融解を行わないプロトコルへの改良
  - ・HGAで見出されたバイオマーカーに絞った診断用メソッドの構築

- ・糖鎖解析の自動化を進めて、世界標準となる解析方法の確立を目指す。
- ・解析装置の小型化、ユーザフレンドリー化を進めて、売価1億円/台、研究所レベル、年間数台規模での実用化を目指す。
- ・小型化した前処理装置を質量分析計との一体型し、医療機器として、中規模以上の医療機関への導入を進める。→ 市場の拡大を図る
- ・装置導入者間でネットワークを構築、解析結果の共有化で、利活用を促進。

# パートナー企業への期待

---

- 新規な糖ペプチド補足用磁性ビーズの開発と生産
- 未販売エンドグリコシダーゼの生産
- 糖ペプチド試料調製キットの開発
- 糖ペプチド分析に基づく小型診断装置の開発
- バイオマーカー探索を指向したグライコプロテオミクスの委託分析・共同研究
- グライコプロテオミクスの事業化支援

# お問い合わせ先

東海国立大学機構 岐阜大学  
学術研究・産学官連携推進本部  
産学官連携推進部門

T E L 058-293-2025

F A X 058-293-2032

e-mail [sangaku@t.gifu-u.ac.jp](mailto:sangaku@t.gifu-u.ac.jp)