

200500717 A

厚生労働科学研究費補助金  
萌芽的先端医療技術推進研究事業

シュガーチップを用いた検査・診断技術の開発

平成17年度 総括研究報告書

主任研究者 隅田 泰生

平成18年(2006年)4月

## 目 次

ページ

### I. 総括研究報告書

|   |   |
|---|---|
| シュガーチップを用いた検査・診断技術の開発<br>隅田泰生（鹿児島大学大学院理工学研究科） | 1 |
|---|---|

### II. 分担研究報告書

|   |    |
|---|----|
| シュガーチップを用いた検査・診断技術の開発<br>隅田泰生（鹿児島大学大学院理工学研究科） | 10 |
|---|----|

|   |    |
|---|----|
| プリオン蛋白質とヘパリン部分構造との相互作用<br>堂浦克美（東北大学大学院医学系研究科） | 22 |
|---|----|

|  |    |
|--|----|
| 糖尿病やその合併症診療への応用<br>片桐秀樹（東北大学大学院医学系研究科） | 27 |
|--|----|

|                                     |    |
|-------------------------------------|----|
| シアル酸含有オリゴ糖鎖の合成<br>石田秀治（岐阜大学応用生物科学部） | 31 |
|-------------------------------------|----|

|   |    |
|---|----|
| オリゴ糖を用いたウイルス感染症の診断技術の開発<br>奥野寿臣（兵庫医科大学病原微生物学） | 36 |
|---|----|

|  |    |
|--|----|
| てんかん等の脳疾患への応用<br>加藤啓子（大阪府立大学生命環境科学研究科） | 38 |
|--|----|

|   |    |
|---|----|
| 多チャンネル同時計測型局在プラズモン共鳴測定装置の開発<br>山田雅雄（株式会社モリテックス） | 43 |
|---|----|

### III. 研究成果の刊行に関する一覧表

### IV. 研究成果の刊行物・印刷

# 総括研究報告

シュガーチップを用いた検査・診断技術の開発

主任研究者 隅田泰生 鹿児島大学大学院理工学研究科 教授

研究要旨

本研究班では、ナノメーターの大きさを持ち生体内で多彩な機能を示し、生命現象に不可欠な役割を有するオリゴ糖鎖とその作用相手である蛋白質や細胞との結合相互作用の迅速解析を可能にしたナノバイオデバイス「シュガーチップ」及び糖鎖固定化金ナノ粒子「SGNP」を、各種疾患の迅速な検査・診断や病原因子の解明といった先端医療技術の開発に応用し、簡便迅速診断技術や新しい薬剤の開発のためのスクリーニング技術を確立することを目的として研究を実施している。具体的には、以下の分担研究者の協力のもと、新規オリゴ糖鎖を順次合成してシュガーチップ並びにSGNPのバリエーションをあげつつ、それらバイオデバイスを用いて(i) ウイルス感染及び癌疾患と細胞表層オリゴ糖、(ii) 糖尿病の病因関連蛋白質、(iii) 血液凝固因子、(iv) 神経コンフォメーション病等脳疾患時に出現する病因関連蛋白質について解析した。また同時に、(v) ナノテクノロジーを用いたハイスループット型測定機器の開発も行った。

研究班員（括弧内は、分担研究テーマ）

主任研究者：

隅田泰生 鹿児島大学大学院理工学研究科・教授

（リンカーおよび硫酸化オリゴ糖の合成、シュガーチップの作製ならびに SPR および MALDI-TOF/MS 解析）

分担研究者：

堂浦克美 東北大学大学院医学系研究科・教授

（プリオン病・神経コンフォメーション病への応用）

奥野寿臣 兵庫医科大学・助教授

（ウイルス感染症への応用）

片桐秀樹 東北大学大学院医学系研究科・教授

（糖尿病やその合併症診療への応用）

石田秀治 岐阜大学応用生物科学部・教授

（シアル酸含有オリゴ糖の合成）

加藤啓子 大阪府立大学農学部・助教授

（てんかん等の脳疾患への応用）

SOBEL Michael ワシントン大学医学部・教授

（インテグリンの分子生物学的的手法による生産と分画・精製）

山田雅雄 モリテックス（株）・ナノバイオサイエンス研究所長

(ハイスループット型多チャンネル型表面プラズモン共鳴測定装置の製造)

研究成果

本年度の成果は、それぞれの分担研究者が詳述しているが、まとめると以下のとおりである。なお、研究に際して、健康危険情報は特になかった。

1. 新規リンカーは総数 8 種のタイプの異なるリンカーを開発した。それらリンカーを利用し、総数 50 種の糖鎖リガンド複合体ライブラリーの調製を終了させ、それらをチップ化してシュガーチップを作製する。この際、96 個の異なるリガンドを同時に測定できる機器、開発中のファイバー型 SPR 装置（後述）なども使用し、ハイスループットスクリーニング技術や迅速検査・診断法の開発を目指した実験を行った。
2. ヘパリン/ヘパラン硫酸部分オリゴ糖鎖 3 種の合成を終了させた。
3. SPR/MS 連続分析という糖鎖結合因子を迅速に同定する方法を検討し、高効率手法を考案した。
4. シアル酸含有糖鎖は後述のように精密合成を進めているが、予試験的に鶏卵由来の八糖ならびにシアリルラクトースをチップ化して、A 型インフルエンザウイルス H3N2 型 2 株、H2N2 型 1 株に対して結合特性を検討した。株によって異なる結合特性がある傾向を認めた。
5.  $\alpha_{11b}$  インテグリンの部分構造リコンビナント蛋白質を 3 種作製し、ヘパリン部分構造二糖チップ、及びヘパリンチップを用いて、ヘパリン結合部位の推定を行い、アミノ酸一次構造から予想された結果とは異なりヘッジ部分に強い結合部があることが示唆された。
6. 糖尿病患者における合併症の診断や発症機構の解明につなげるべく、糖尿病性網膜症・神経障害・動脈硬化症をそれぞれ有する患者と有しない糖尿病患者より血清を採取し、20 種のシュガーチップを用いて糖鎖特異的結合蛋白を検討した。それぞれ結合パターンが異なる傾向を認めた。
7. ヘパリンチップを用いて異常型プリオン蛋白(プリオン)が検出できるかどうかの検討を、異常型プリオン蛋白を発現する持続感染細胞の細胞溶解液と非感染細胞の細胞溶解液を用いて表面プラズモン法で実施した。その結果、感染細胞溶解液に比べて持続感染細胞溶解液で強いシグナルが得られた。そこで、詳細に検出シグナルの特異性を検証するとともに、検出感度を向上させる解析条件について検討を加えた。
8. てんかん発症機構に関する研究は本年は以下の 2 点に絞り研究を進めた。(i) てんかんモデルマウスを定常的に作成しサンプルを提供するシステムを構築した。(ii) てんかん発作獲得前(ステージ 3)、てんかん発作獲得後(ステージ 5) の大脳皮質(前脳)、視床、および海馬を用いて、マウス・ジーンチップアレイをおこなった結果、特に糖鎖修飾関連分子や糖鎖結合因子の著しい発現の増減を観測した。この結果はシュガーチップを利用する際の糖鎖構造の選定に大きく寄与するものであり、検査法としての応用が可能であることを強く示唆した。
9. シアル酸糖鎖の有機化学的構築に関しては、糖鎖構築をより効率的に行うための

方法論の開発及びそれらを応用した複雑な糖鎖の構築を行った。前者では、以下の2点で成果を得た。①TDBS効果を用いた $\alpha$ -Gal、 $\alpha$ -GalNAcの立体選択的構築法の確立本法の確立により、ムチン型糖タンパク質糖鎖のコア構造の効率的な構築が可能となった。この方法を応用して、順次ムチン型糖鎖の合成を進めていく。②新規シアル酸受容体を用いる効率的オリゴシアル酸構築法を確立させるため、糖結合反応における受容体としての反応性を格段に高めたシアル酸誘導体を設計することに成功し、シアリル $\alpha$ (2-8)シアル酸、シアリル $\alpha$ (2-4)シアル酸を構築した。来年度以降、更に複雑なオリゴシアロ糖鎖の構築に応用していく。後者では、以下の3つの成果を上げた。①ガン抗原として知られるシアリルルイスX抗原を含有するムチン型糖鎖タンパク質糖鎖の構築；②白血球の交通制御(Trafficking)に重要な役割を果たしている硫酸化シアリルルイスX糖鎖のバリエーション型の構築；③疾病診断への応用が期待される病原性細菌から分泌されるエンド- $\alpha$ -GalNAcaseの高感度基質の設計・合成。

10. 金微粒子の局在プラズモン現象を応用した、光ファイバー型簡易検査・測定装置の開発を進めた。この装置は、光ファイバー端面に金微粒子を修飾した光ファイバーに光を入射させ、端面からの戻り光を測定する方式のバイオセンサーである。光ファイバー端面の金微粒子による局在プラズモン現象により、金微粒子表面の屈折率変化に応じて、戻り光の光強度が変化する。この光強度をモニターすることにより、金微粒子表面における糖鎖とタンパク等の相互作用を検出することができる。まず、初期検討用のため、第一試作装置を2台製作した。うち一台は、糖鎖-蛋白質相互作用の実測定の検討を行うために使用し、もう一台を用いて、実際の検査・測定装置として使用するにあたり必要な感度を得るための検討、および装置構成の検討を行っている。これまでに検出器、光ファイバのカップリング方法、その他装置構成部品の検討を行ってきた。当初は光検出器として光電子増倍管(PMT)を用いていたが、アバランシェ・フォトダイオード(APD)を使用することによりSN比が約2倍増加するという結果が得られた。また、光源としてLEDを使用するため光ファイバーへの光入射方法の検討の結果、コリメータレンズを用いてカップリング効率を上げることによるSN比の向上が見られた。また多チャンネル化のための装置構成の検討とともに、簡易型の測定装置とするための装置構成の簡略化の検討を進めている。

## 研究発表

### 1. 論文・著書

隅田泰生、「糖鎖チップ」、糖鎖科学の新展開－機能解明・次世代型材料・医薬品開発に向けて(編者：谷口直之、伊藤幸也、p.474-481)、エヌティーエス、2005年発行

隅田泰生、「表面プラズモン共鳴・糖鎖チップを用いた糖鎖-タンパク質相互作用の解析」、未来を拓く糖鎖科学(p.74-75)、金芳堂、2005年発行

Yasuo Suda, Akio Arano, Yasuhiro Fukui, Shuhei Koshida, Masahiro Wakao, Tomoaki Nishimura, Shoichi Kusumoto and Michael Sobel (2006) Immobilization and Clustering of Structurally Defined Oligosaccharides for Sugar Chips: An Improved Method for Surface

- Plasmon Resonance Analysis of Protein-Carbohydrate Interactions, submitted
- Kawatake S, Nishimura Y, Sakaguchi S, Iwaki T, Doh-ura K: Surface plasmon resonance analysis for the screening of anti-prion compounds. *Biol Pharm Bull.* (in press), 2006
- Rainov NG, Whittle IR, Doh-ura K: Treatment options in patients with prion disease-the role of long term cerebroventricular infusion of pentosan polysulphate. In: *Prions-Food and Drug Safety.* (ed. Kitamoto T) Springer pp.41-66, 2005
- Todd NV, Morrow J, Doh-ura K, Dealler S, O'Hare S, Farling P, Duddy M, Rainov NG: Cerebroventricular infusion of pentosan polysulphate in human variant Creutzfeldt-Jakob disease. *J Infect Dis.* 50(5):394-396, 2005
- Tsuboi Y, Baba Y, Doh-ura K, Imamura A, Fujioka S, Yamada T: Diffusion-weighted MRI in familial Creutzfeldt-Jacob disease with the codon 200 mutation in the prion protein gene. *J Neurol Sci.* 232:45-49, 2005
- Sasaki K, Doh-Ura K, Wakisaka Y, Tomoda H, Iwaki T: Fatal familial insomnia with an unusual prion protein deposition pattern: an autopsy report with an experimental transmission study. *Neuropathol Appl Neurobiol.* Feb;31(1):80-87, 2005
- 逆瀬川裕二、堂浦克美：プリオン病の治療法の現状。医学のあゆみ 215(11):901-905, 2005
- 坪井義夫、山田達夫、堂浦克美：プリオン病の治療ーペントサンポリサルフェート脳室内持続投与ー。神経内科 63 (5) : 441-445, 2005
- 坪井義夫、山田達夫、堂浦克美：プリオン病の治療ー経口キナクリン療法とペントサン硫酸の脳室内持続投与法の現状。Brain Medical. 17(3):259-264, 2005
- 石川謙介、堂浦克美：プリオンイメージングの試み。臨床神経科学 24(3):313-316, 2006
- Yamada, T., Katagiri, H., Ishigaki, Y., Ogihara, T., Imai, J., Uno, K., Hasegawa, Y., Gao, J., Ishihara, H., Niijima A., Mano, H., Aburatani, H., Asano, T., Oka Y. (2006) Signals from intra-abdominal fat modulate insulin and leptin sensitivity through different mechanisms: Neuronal involvement in food intake regulation.. *Cell Metab.*3, 223-9
- Anai, M., Shojima, N., Katagiri, H., Ogihara, T., Sakoda, H., Onishi, Y., Ono, H., Fujishiro, M., Fukushima, Y., Horike, N., Viana, A., Kikuchi, M., Noguchi, N., Takahashi, S., Tanaka, K., Oka, Y., Uchijima, Y., Kurihara, H., Asano, T. (2005) A novel protein kinase B (PKB)/AKT-binding protein enhances PKB kinase activity and regulates DNA synthesis. *J Biol Chem.* 280, 18525-35.
- Ishigaki, Y., Katagiri, H., Yamada, T., Ogihara, T., Imai, J., Uno, K., Hasegawa, Y., Gao, J., Ishihara, H., Shimosegawa, T., Sakoda, H., Asano, T., Oka, Y. (2005) Dissipating excess energy stored in the liver is a potential treatment strategy for diabetes associated with obesity. *Diabetes.* 54, 322-332
- Imai, J., Katagiri, H., Yamada, T., Ishigaki, Y., Ogihara, T., Uno, K., Hasegawa, Y., Ishihara, H., Sasano, H., Mizuguchi, H., Asano, T., Oka, Y. (2005) Constitutively active PDX1 induced efficient insulin production in adult murine liver. *Biochem Biophys Res Commun.* 326, 402-9
- Shojima, N., Ogihara, T., Inukai, K., Fujishiro, M., Sakoda, H., Kushiya, A., Katagiri, H., Anai, M., Ono, H., Fukushima, Y., Horike, N., Viana, AY., Uchijima, Y., Kurihara, H., Asano

- T. (2005) Serum concentrations of resistin-like molecules beta and gamma are elevated in high-fat-fed and obese db/db mice with increased production in the intestinal tract and bone marrow. *Diabetologia*. 48, 984-92.
- Kushiya, A., Shojima, N., Ogihara, T., Inukai, K., Sakoda, H., Fujishiro, M., Fukushima, Y., Anai, M., Ono, H., Horike, N., Vianna, A.Y., Uchijima, Y., Nishiyama, K., Shimosawa, T., Fujita, T., Katagiri, H., Oka, Y., Kurihara, H., Asano, T. (2005) Resistin like molecule beta activates MAPKs, suppresses insulin signaling in hepatocytes and induces diabetes, hyperlipidemia and fatty liver in transgenic mice on a high-fat diet. *J. Biol. Chem.* 280. 42016-25.
- Takahashi, R., Ishihara, H., Tamura, A., Yamaguchi, S, Yamada, T., Takei, D., Katagiri, H., Endou, H., Oka Y. (2005) Cell-type specific activation of metabolism reveals that beta-cell secretion suppresses glucagons release from alpha-cells in rat pancreatic islets. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 290, E308-16.
- Yamaguchi, M., Ishida, H., Kanamori, A., Kannagi, R. and Kiso, M.: 6-O-Sulfo sialylparagloboside and sialyl Lewis X neo-glycolipids containing lactamized neuraminic acid: synthesis and antigenic reactivity against G159 monoclonal antibody. *Glycoconjugate Journal*, 22, 95-108, 2005.
- Otsubo, N., Ishida, H., Kannagi, R. and Kiso, M.: Design and synthesis of a novel neo-glycolipid containing sialyl Lewis X determinant carried on the mucin GlcNAc1-6GalNAc core structure. *Tetrahedron: Asymmetry*, 16(7), 1321-1327, 2005.
- Imamura, A., Ando, H., Ishida, H. and Kiso, M.: Di-tert-butylsilylene(DTBS)-directed a-selective synthesis of 4-methylumbelliferyl T-antigen. *Organic Letters*, 7(20), 4415-4418, 2005.
- Ando, H., Koike, Y., Koizumi, S., Ishida, H. and Kiso, M.: 1,5-Lactamized sialyl acceptors for various disialoside syntheses: Novel synthesis method for glycan portions of Hp-s6 and HLG-2 gangliosides. *Angewandte Chemie, International Edition in English*, 6759-6763, 2005.
- 加藤啓子 平林義雄 小脳グリア細胞の分化機構—糖鎖生物学の視点から—  
CLINICAL NEUROSCIENCE (臨床神経科学) 中外医学社 vol.23(2) 144-147 2005

## 2. 学会発表

- 隅田泰生、「シュガーチップ」、センサ・アクチュエータ・マイクロマシン/ウィーク  
2005 総合シンポジウム、東京都江東区、2005年4月7日
- 隅田泰生、「シュガーチップ」、第45回澱粉研究懇談会(第45回澱粉研究懇談会資料  
集、2005、p. 11-20)、静岡県伊東市、2005年6月2日
- 岸本裕子、西村知晃、山下早希子、中川裕美、濱松三奈、上谷昌稔、若尾雅広、隅田  
泰生、「糖鎖固定化金ナノ粒子：糖鎖-蛋白質相互作用の on-site 解析ツール」、第25  
回日本糖質学会年会(第25回日本糖質学会年会要旨集、2005、p. 123) 滋賀県大津市、  
2005年7月22日
- 西村知晃、岸本裕子、山下早希子、中川裕美、佐藤昌紀、齊藤彰寛、若尾雅広、J.  
Murray-Wijelath, E. Wijelath, K. Strand, M. Sobel, 隅田泰生、「表面プラズモン共鳴法を



- 用いた糖鎖-蛋白質相互作用の解析システム」、第 25 回日本糖質学会年会 (第 25 回日本糖質学会年会要旨集、2005, p. 124) 滋賀県大津市、2005 年 7 月 22 日
- Y. Suda, T. Nishimura, Y. Kishimoto, S. Yamashita, M. Sato, M. Uetani, M. Hamamatsu, A. Saito, M. Wakao, J. Murray-Wijelath, E. Wijelath, K. Strand, M. Sobel, 「Advanced analytical systems for the binding interaction of structurally defined oligosaccharides with proteins/cells: use of surface plasmon resonance (SPR) or gold nanoparticles (GNP)」, XVIII International Symposium on Glycoconjugates (Glycoconjugates J., 2005, 22: 201)、イタリア フィレンツェ、2005 年 9 月 8 日
- 隅田 泰生、「構造明確なオリゴ糖鎖と蛋白質/細胞との結合相互作用分析システム：表面プラズモン共鳴ならびに金ナノ粒子の利用」、第 3 回糖鎖科学コンソーシアムシンポジウム (第 3 回糖鎖科学コンソーシアムシンポジウム要旨集、2005, p. 32-33)、東京都品川区、2005 年 12 月 6 日
- Y. Suda, Y. Kishimoto, T. Nishimura, S. Yamashita, H. Nakagawa, M. Hamamatsu, M. Uetani, M. Wakao, "Carbohydrate-immobilized gold nano-particle: An on-site analytical tool for detecting the interactions between oligosaccharides and protein", Pacificchem 2005 (Program # 898), アメリカ ハワイ州ホノルル, 2005 年 12 月 19 日
- Y. Suda, T. Nishimura, Y. Kishimoto, S. Yamashita, H. Nakagawa, A. Arano, M. Sato, A. Saito, M. Wakao, "Development of a sugar chip: advanced analytical system for the binding interaction of structurally defined oligosaccharides using surface plasmon resonance", Pacificchem 2005 (Program # 1005), アメリカ ハワイ州ホノルル, 2005 年 12 月 20 日
- 齋藤彰寛、大石紘、西村知晃、岸本裕子、若尾雅広、隅田泰生、「種々のヘパリン部分構造のシュガーチップ化」、日本化学会第 86 年会 (3G3-40)、2005 年 3 月 29 日
- 若尾雅広、猿渡梨紗、西村知晃、岸本裕子、隅田泰生、「ムチン型糖鎖のシュガーチップ化」、日本化学会第 86 年会 (3G3-41)、2005 年 3 月 29 日
- 若尾雅広、高橋優子、山下早希子、西村知晃、岸本裕子、隅田泰生、「シアリルラクト系糖鎖の化学・酵素合成とそのシュガーチップ化」、日本化学会第 86 年会 (3G3-42)、2005 年 3 月 29 日
- 若尾雅広、小川智央、鈴木啓悟、名荷谷徹、牟田健一、齋藤敦、岩本俊夫、木村光徳、梶川浩太郎、隅田泰生、「光ファイバー型シュガーチップの作製とその評価」、日本化学会第 86 年会 (4G6-20)、2005 年 3 月 30 日
- 堂浦克美：プリオン病治療法の開発。第 7 回生命化学研究会シンポジウム、仙台、2005 年 1 月 21 日
- 逆瀬川裕二、渡辺光太、八谷如美、堂浦克美、金子清俊：リコンビナントプリオン蛋白質を用いた蛋白質 unfolding 因子の探索。2005 年プリオン研究会、天童、2005 年 8 月 26、27 日
- 坪井義夫、堂浦克美、山田達夫：CJD の新しい治療法の試み - ペントサンプリサルフェート脳室内持続投与。2005 年プリオン研究会、天童、2005 年 8 月 26、27 日
- 照屋健太、堂浦克美：GPI アンカー型プリオン蛋白質アナログの調製。2005 年プリオン研究会、天童、2005 年 8 月 26、27 日
- Ishikawa K, Kudo Y, Nishida N, Suemoto T, Sawada T, Iwaki T, Doh-ura K: Amyloid imaging

probes for detection of prion plaques and treatment of prion diseases. 2005 Japan-America Frontiers of Engineering Symposium, Hitachi Global Storage Technologies, San Jose, CA, November 3-5, 2005

逆瀬川裕二、渡邊光太、八谷如美、堂浦克美、金子清俊 : The ATP-bound form of Hsp90 can unfold recombinant prion protein. 日本分子生物学会第 28 回年会大阪、2005 年 12 月 7 日-10 日

片桐秀樹、荻原健英、今井淳太、長谷川豊、岡芳知 シンポジウム 9 内分泌領域における再生医療学 インスリン欠乏モデルマウスへの糖尿病再生治療 第 78 回日本内分泌学会学術総会 2005 年 7 月 2 日東京

片桐秀樹 UCP1 遺伝子導入による肥満・糖尿病に対する治療法開発 体温調節、温度受容研究会 2005 年 9 月 27-28 日 自然科学研究機構岡崎研究所

片桐秀樹、宇野健司、山田哲也、岡芳知 ワークショップ脂肪肝 肝における PPAR  $\gamma$  発現は、脂肪肝・肝インスリン抵抗性を悪化させるが、肥満や耐糖能を改善させる 第 20 回日本糖尿病合併症学会 2005 年 10 月 7 日-8 日 東京

片桐秀樹、石垣泰、山田哲也、宇野健司、岡芳知 ワークショップ肥満・糖尿病の発症機構 臓器・組織間エネルギー代謝情報ネットワーク機構とその治療応用 第 28 回日本分子生物学会年会 2005 年 12 月 7 日-10 日 福岡

片桐秀樹 個体における代謝調節とメタボリックシンドローム 第 24 回ヒューマンサイエンス総合研究セミナー 2006 年 1 月 17 日 東京

Ogihara T., Katagiri H., Hasegawa Y., Oka Y. Regeneration of Pancreatic  $\beta$  Cells after Bone Marrow Transplantation in Streptozotocin-treated Mice. Keystone Symposia, Diabetes Mellitus: Molecular Mechanisms, Genetics and New Therapies. Jan 27-Feb 2, 2005 Keystone, Colorado, USA

Uno K., Katagiri H., Hasegawa Y., Oka Y. Hepatic PPAR $\gamma$  Expression Induced Redistribution of Fat Storage and Improved Insulin Resistance in Obese Mice. American Diabetes Association, 65th Scientific Sessions, June 10-14 2005 San Diego, California, USA

Yamada T., Katagiri H., Ishigaki Y., Oka Y. Modulation of Hypothalamic Leptin Resistance by Signals from Intra-Abdominal Fat Tissue. American Diabetes Association, 65th Scientific Sessions, June 10-14 2005 San Diego, California, USA

Hasegawa Y., Katagiri H., Ogihara T., Ishigaki Y., Yamada T., Imai J., Uno K., Gao J., Oka Y. A Role of eNOS in Pancreatic  $\beta$  cell Regeneration after Bone Marrow Transplantation in Streptozotocin-Induced Diabetic Mice. American Diabetes Association, 65th Scientific Sessions, June 10-14 2005 San Diego, California, USA

Katagiri H. Cross-talk between organs/tissues in the regulation of glucose and energy metabolism. Tohoku University 21st century COE program The 2nd International Symposium -Signal Transduction and Metabolic Disorders- November 17-18 2005, Sendai, Japan

Ogihara T., Katagiri H., Hasegawa Y., Oka Y. Role of eNOS in  $\beta$  cell regeneration after bone marrow transplantation in STZ-diabetic mouse models. Hot Topics I. Keystone Symposia, Diabetes Mellitus and the control of cellular energy metabolism. Jan 21-26, 2006 Vancouver, British Columbia, Canada

- 片野由加里、安藤弘宗、石田秀治、木曾真：環状ペプチド架台を用いた糖鎖プローブの構築：Development of oligosaccharide probe using neo-cyclicpeptide scaffold. 第25回日本糖質学会年会.(July 20-22, 2005,京都)
- 澤田敏彦、橋本智裕、中野博文、重松幹二、石田秀治、木曾真：密度汎関数理論による $\alpha$ -N-アセチルノイラミン酸の構造研究；Conformational Study of  $\alpha$ -N-Acetylneuraminic Acid by Density Functional Theorey. 第25回日本糖質学会年会.(July 20-22, 2005,京都)
- 今村彰宏、安藤弘宗、木村彰克、石田秀治、木曾真：4,6-O-DTBS 基を利用した高立体選択的新規 $\alpha$ ガラクトシル化：A Novel and Highly Stereoselective  $\alpha$ -Glactosylation Employing 4,6-O-di-tert-Butylsilylene(DTBS) Group. 第25回日本糖質学会年会.(July 20-22, 2005,京都)
- 清水浩代、小池悠介、小泉幸子、安藤弘宗、石田秀治、木曾真：棘皮動物由来新規ガングリオシド HPG-1 の合成研究：Synthetic study of a novel ganglioside HPG-1 isolated from *Holothuria pervicax*. 第25回日本糖質学会年会.(July 20-22, 2005,京都)
- 木村彰克、今村彰宏、石田秀治、木曾真：DTBS 効果を利用したムチン型糖鎖の合成：Efficient synthesis of mucin-type oligosaccharides based on DTBS effect. 第25回日本糖質学会年会.(July 20-22, 2005,京都)
- 加藤裕貴、石原幹生、石田秀治、木曾真：ガングリオシド-KLH 複合体合成に向けた新規糖鎖プローブの開発：Design and Synthesis of Novel Oligosaccharide Probes Useful for Conjugation with KLH. 第25回日本糖質学会年会.(July 20-22, 2005,京都)
- 山仲毅、井上望、今村彰宏、石田秀治、木曾真：DTBS 効果を利用したムチン型糖鎖ライブラリーの合成研究：Systematic synthesis of mucin oligosaccharides library based on strategy. 第25回日本糖質学会年会.(July 20-22, 2005,京都)
- Kanamaru, Y., Miyajima, A., Yang, S.-M., Nagaoka, S., Ishida, H. and Kiso, M.: Novel carbohydrate structures recognized by a human-specific monoclonal antibody 1CF11. XVIII International Symposium on Glycoconjugates. (September 4th-9th, 2005, Florence, Italy)
- Yamaguchi, M., Ishida, H., Kanamori, A., Kannagi, R. and Kiso, M.: Lactamized sialyl 6-O-sulfo paragloboside & Lewis X neoglycolipids: synthesis and antigenic reactivity against G159 monoclonal antibody. XVIII International Symposium on Glycoconjugates. (September 4th-9th, 2005, Florence, Italy)
- 加藤啓子、宮本佳苗、関野真司、桑村充、遠藤昌吾、大須賀壮、平林義雄：てんかん発症関連糖質代謝系分子群の発現と神経機能への影響。文部科学省・特定領域「糖鎖によりたんぱく質と分子複合体の機能調節」第4回公開シンポジウムプログラム 平成18年1月31日 名古屋ガーデンパレス 招待講演
- 酒井玲美、平林義雄、加藤啓子：シアル酸合成系に関わる4種酵素 mRNAs の成熟マウス海馬における発現 文部科学省・特定領域「糖鎖によりたんぱく質と分子複合体の機能調節」平成17年第3回夏期シンポジウム 平成17年8月8-9日 ルネッサンス岐阜ホテル
- 加藤啓子：視床を介する神経回路の可視化と神経可塑性の分子生物学的解析 文部科学省・特定領域「神経回路」平成16年度班会議 京都大学芝欄会館 平成17年1

月 26-28 日

酒井玲美、岡田利也、加藤啓子 シアル酸合成系に関わる 4 種の酵素の成熟マウス海馬における発現 第 140 回日本獣医学会学術集会（平成 17 年秋）平成 17 年 9 月 29 日－10 月 2 日

### 3. 知的財産権の出願・登録状況

隅田泰生、西村知晃、岸本裕子、中川裕美、「新規糖固定化金属ナノ粒子およびこれを用いて糖－タンパク質相互作用を測定する方法、並びに糖－タンパク質相互作用体からタンパク質を回収する方法」、特願 2005-154550、出願日：2005 年 5 月 26 日

若尾雅広、隅田泰生、小川智央、「支持体に対する金属微粒子膜の形成方法及び局在プラズモン共鳴センサ」、特願 2006-66735、2006 年 3 月 10 日

堂浦克美、「プリオン病発症予防剤とそれを含む食品添加剤及び飼料添加剤」、特願 2005-51999、2005 年 2 月 25 日

堂浦克美、岡周作、弘田量二、角田正也、「哺乳動物組織材料の前処理方法」、特願 2005-293011、2005 年 10 月 5 日

工藤幸司、荒井啓行、岡村信行、古本祥三、丸山将浩、堂浦克美、「コンフォメーション病診断および治療用の長波長蛍光物質を含む組成物」、特願 2005-347818、2005 年 12 月 1 日

工藤幸司、荒井啓行、岡村信行、古本祥三、丸山将浩、堂浦克美、「コンフォメーション病の診断用プローブ」、特願 2005-371821、2005 年 12 月 26 日

### 4. その他（研究に関する新聞記事等）

2006 年 3 月 8 日朝刊 新聞報道

毎日新聞 「内臓脂肪に食欲ブレーキ内蔵－東北大グループ」

朝日新聞 「内臓脂肪、神経介し「食欲抑制」－東北大発見」

読売新聞 「内臓脂肪からやせる信号－東北大グループ」

産経新聞 「内臓脂肪過食ストッパー－東北大発見」

日経産業新聞 「内臓脂肪、食欲に関与－東北大が解明」

日刊工業新聞 「食欲調節に関与－東北大 肥満治療創薬に道」など

産経新聞は、さらに 2006 年 3 月 22 日朝刊にて「内臓脂肪から食欲抑制信号－東北大グループメカニズムを解明－」のタイトルで特集記事。

2006 年 3 月 8 日テレビ報道

NHK ニュース 「内臓脂肪の神経信号が食欲調節」など

2006 年 3 月 8 日ラジオ報道

全国のラジオニュースで報道

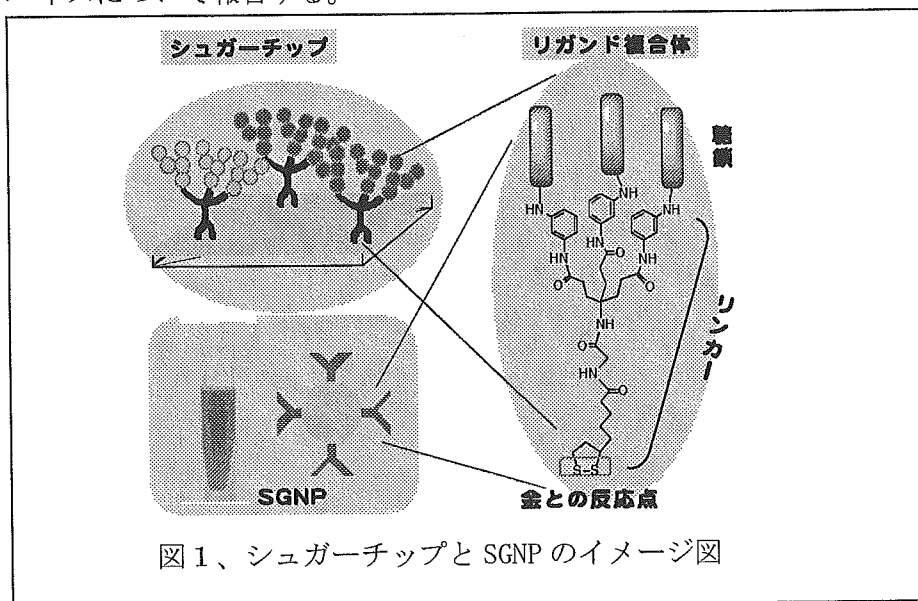
# 分 担 研 究 報 告

シュガーチップを用いた検査・診断技術の開発

主任研究者 隅田泰生 鹿児島大学 大学院理工学研究科・教授

1. はじめに

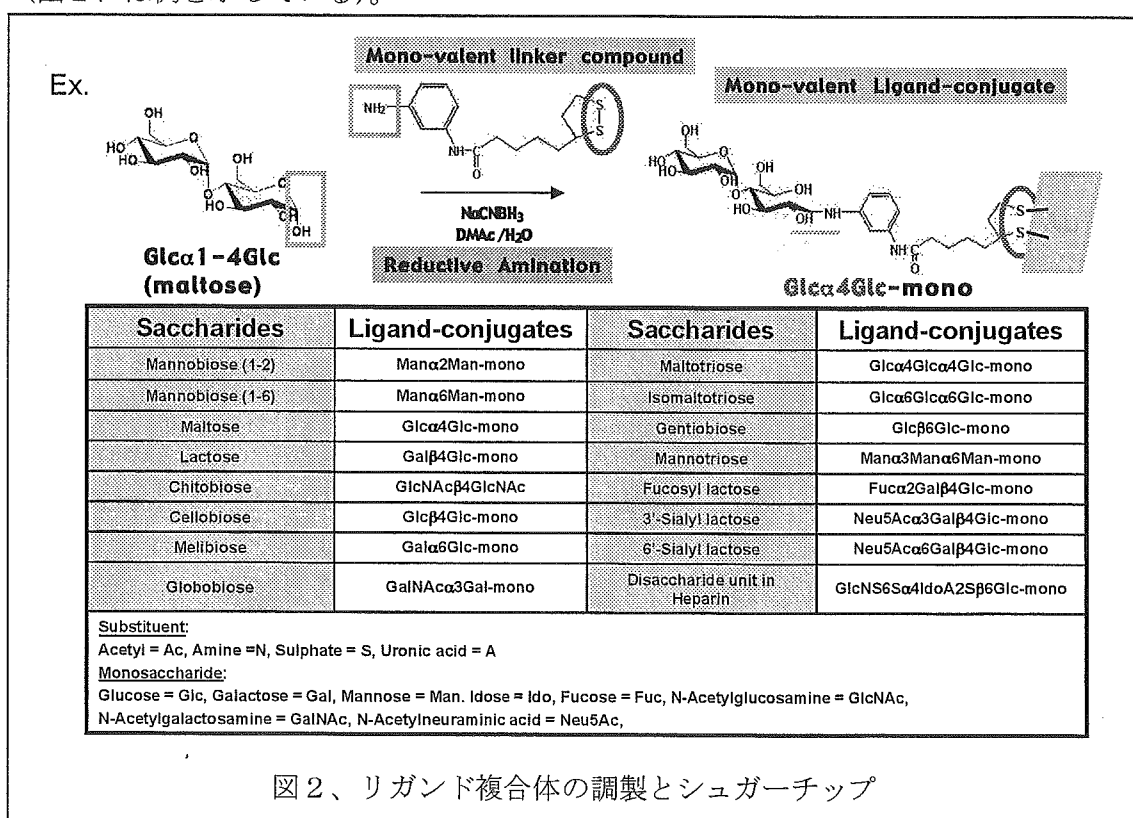
数 nm の大きさを持つオリゴ糖鎖は生体内で多彩な機能を示し、生命現象に不可欠な役割を有することが明らかになってきた[1]。分子レベル（＝ナノメータースケール）で糖鎖の生理活性を解析することは非常に重要であるが、構造明確なオリゴ糖鎖を十分量得ることは困難が伴う。また、オリゴ糖1分子の活性は弱く、生体内ではそれらが集合して働いている。これらの特徴を持つオリゴ糖鎖とその作用相手である蛋白質や細胞との結合相互作用を、作用相手を標識することなく迅速に解析することを目的として、我々は構造明確なオリゴ糖鎖の有効利用と集合化を同時に達成するナノバイオデバイス「シュガーチップ」及び糖鎖固定化金ナノ粒子「SGNP」を開発している（図1にそれらのイメージを示す）[2-7]。本研究は、これらのナノバイオデバイスを迅速な検査・診断や病原因子の解明といった先端医療技術の開発に応用し、糖鎖が関係する疾患の簡便迅速診断技術や新しい薬剤の開発のためのスクリーニング技術を確立することを目標として行っているものである。具体的には、(i) ウイルス感染及び癌疾患と細胞表層オリゴ糖、(ii) 糖尿病の病因関連蛋白質、(iii) 血液凝固因子（血液中の蛋白質・細胞）、(iv) 神経コンフォメーション病やてんかん等の脳疾患時に出現する病因関連蛋白質についてシュガーチップを用いて解析すると同時に、(v) ナノテクノロジーを用いたハイスループット型測定機器の開発を行っている。それぞれの疾患を対象とした成果、また糖鎖の化学合成や新規測定装置については、各班員がそれぞれ詳細に本報告書に記載しているので、ここでは主として隅田が担当しているナノバイオデバイスについて報告する。



## 2. シュガーチップ

### 2-1. リガンド複合体の調製

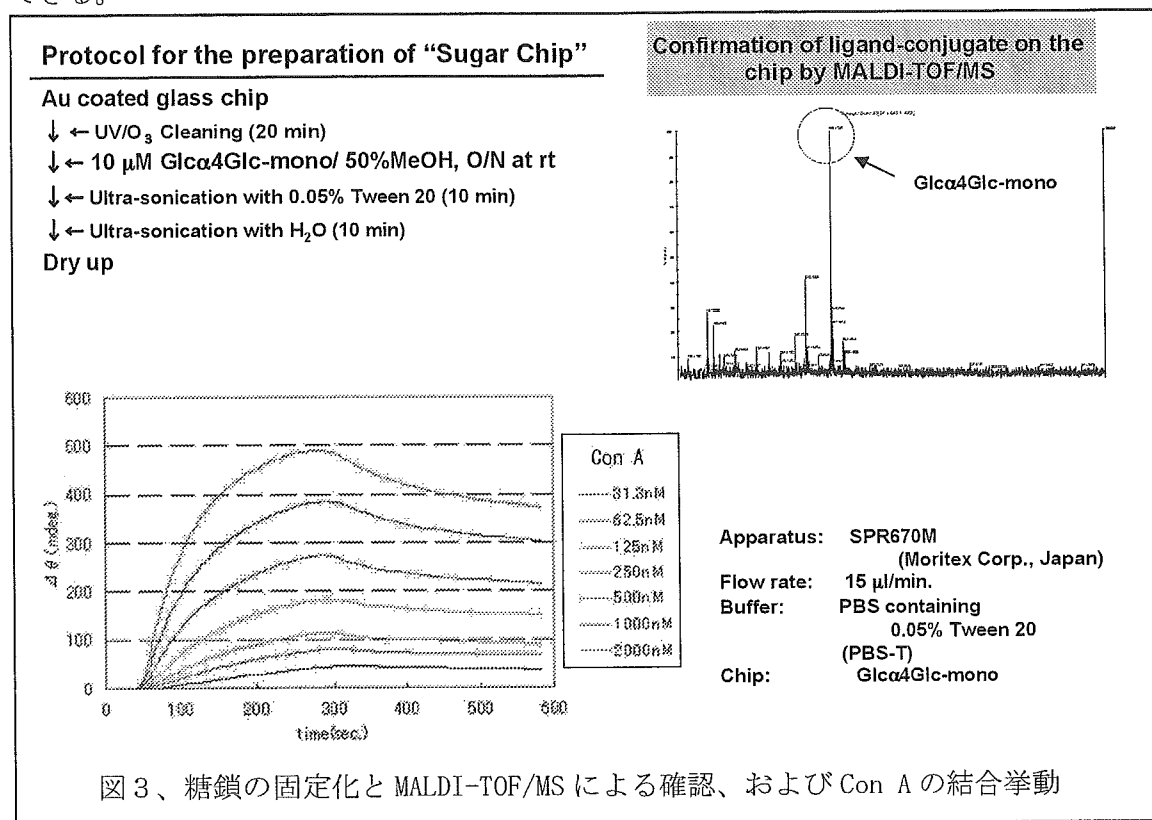
ガラスに金薄膜がコートされているチップに糖鎖を固定化する際に、我々は天然界から加水分解やエンドグルコシダーゼ等の酵素処理によって得られるオリゴ糖鎖をも化学修飾せずに利用し固定化することが重要であると考えた。そして、予試験的検討の結果から穏和な反応である還元アミノ化反応を利用することとした[8]。このために、まずリンカーと称する化合物を合成した。このリンカーには、還元アミノ化反応を効率よく進行させるための芳香族アミノ基と、金と Au-S 結合を形成し、かつ糖鎖との複合体（リガンド複合体と総称）の精製を容易にする分子内環状 S-S 結合が存在する。図2中の糖鎖を一単位導入することができるリンカー（monovalent linker）や複数単位導入できるリンカーと、合成や天然物からの分離などによって得られる還元末端を有するオリゴ糖とを反応させて、現在までに約50種類のリガンド複合体を調製した（図2には例を示している）。



### 2-2. シュガーチップによる糖鎖結合蛋白質と結合挙動の決定

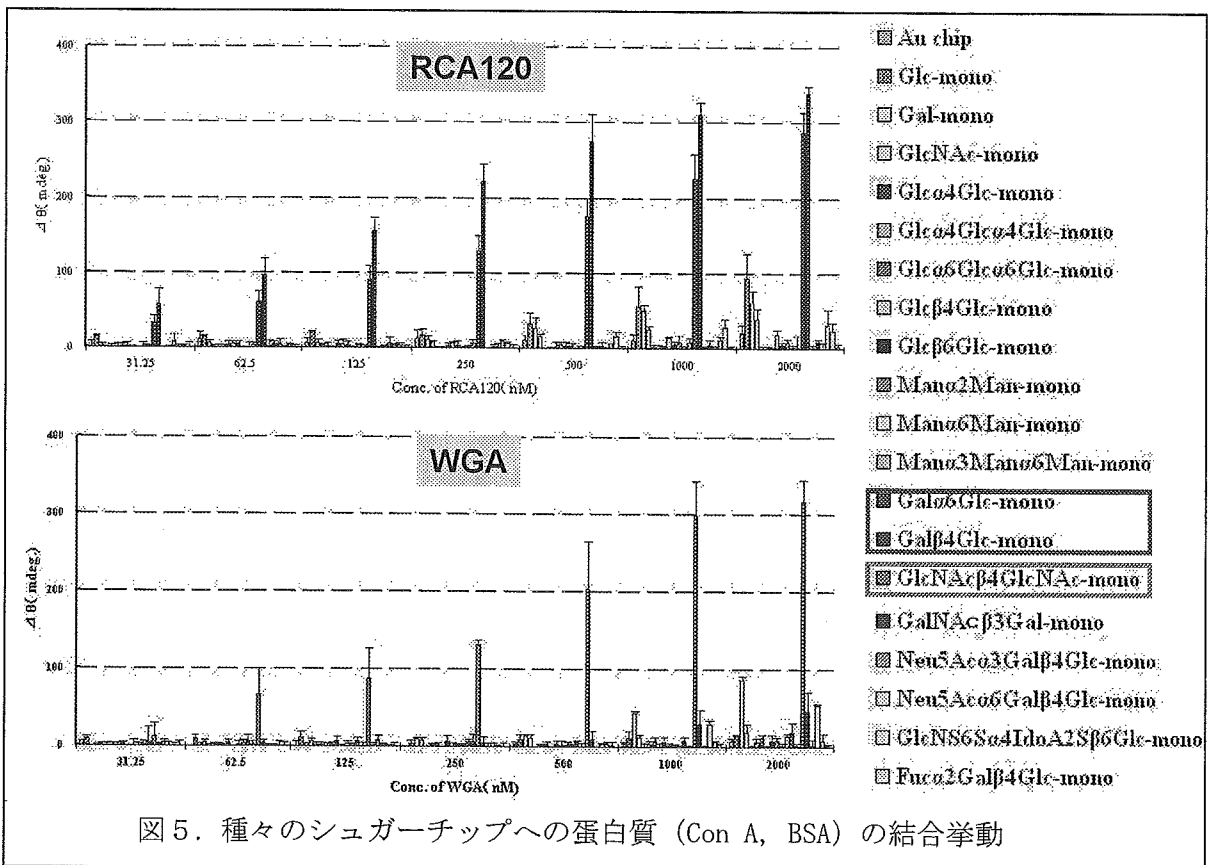
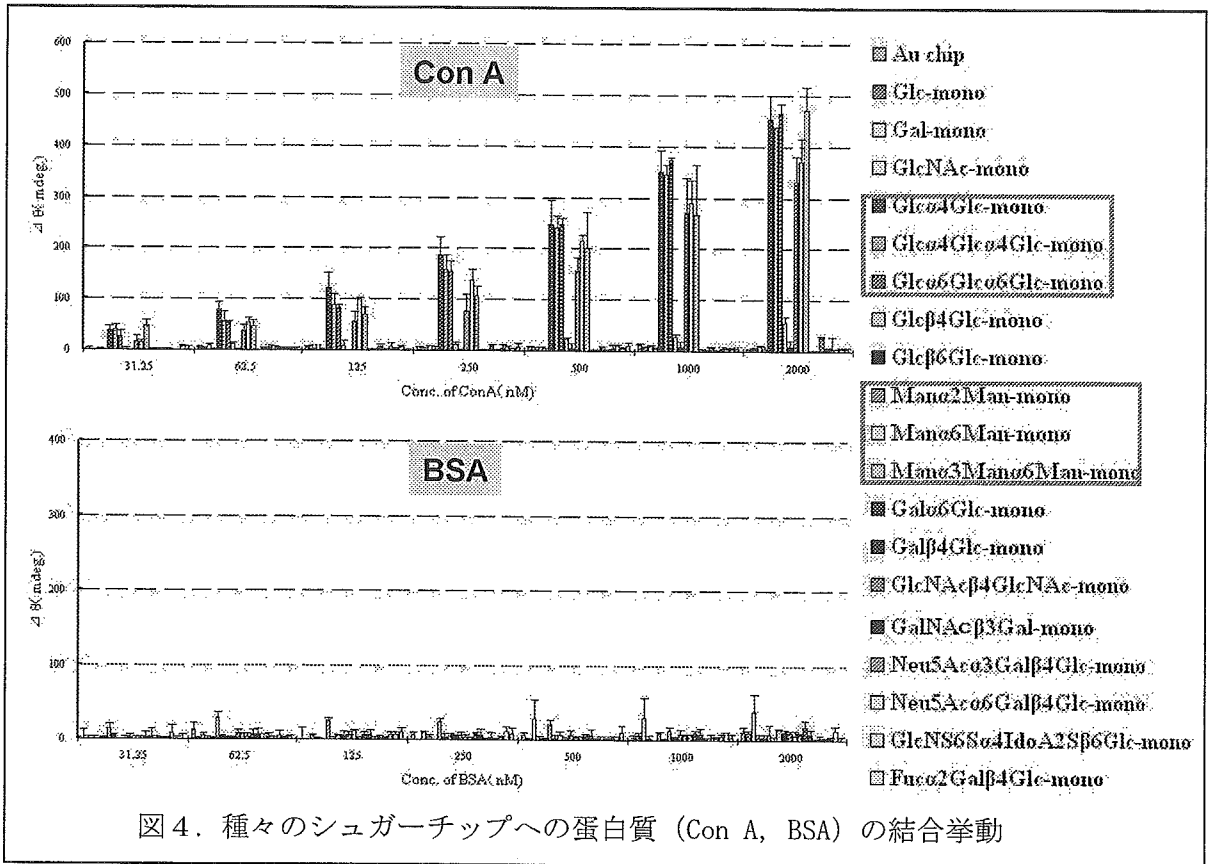
調製したリガンド複合体は、その溶液を金と接触させることで Au-S 結合を形成させ、金チップに糖鎖を固定化することができ、MALDI-TOF/MS によってその分子質量を検出できることからその固定化を確認した（図3）。シュガーチップを用いた糖鎖結合蛋白質の表面プラズモン共鳴 (SPR) 法による測定例を図3に示す。この測定法を用いることによって、糖鎖の相互作用相手の蛋白質や細胞を無標識で測定することができる。α グルコースを含む糖鎖を固定化したシュガーチップに対するコンカナバリン A (Con A) の濃度依存的な結合が観測され、糖鎖との結合をリアルタイムで観測できることがわかった。種々のシュガーチップを用いた蛋白質の結合特性を調べた例を図4および5

に示す。これらから、それぞれの糖鎖への蛋白質の結合パラメーターを求めることができる。

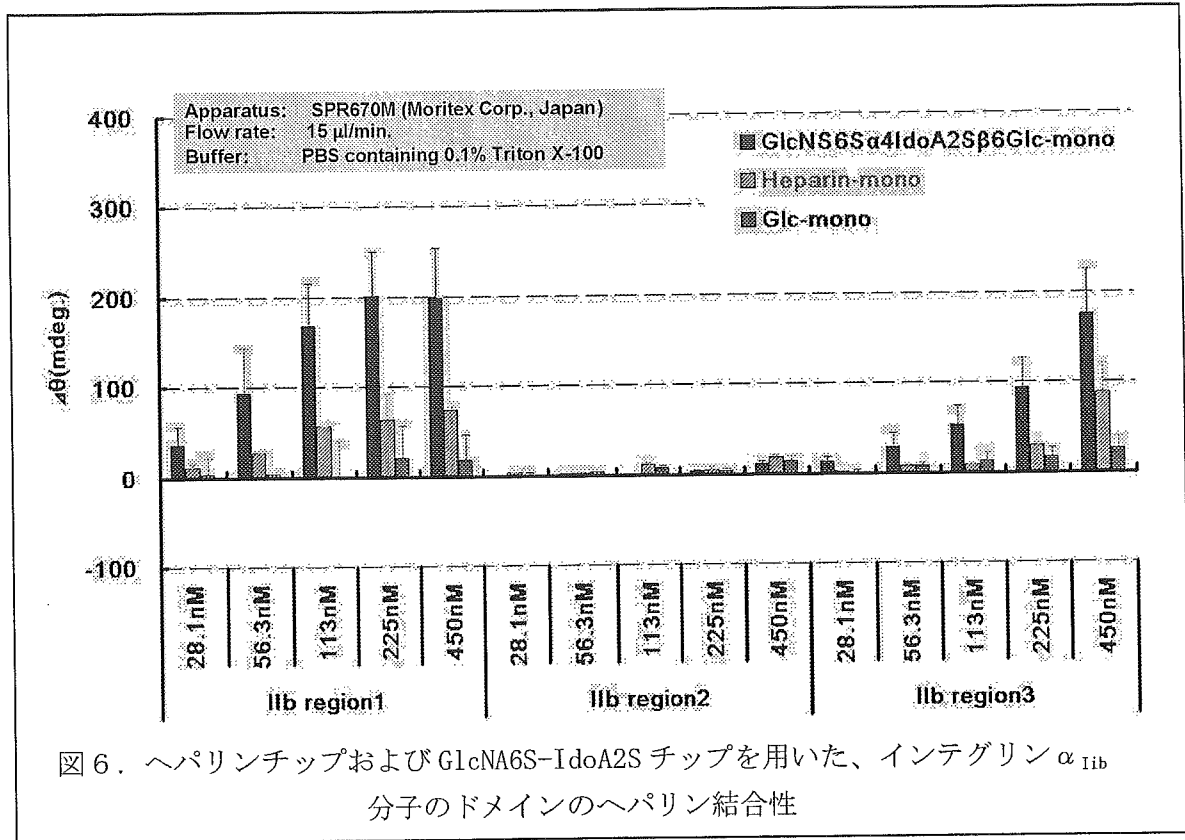


応用例として、ワシントン大学医学部の Sobel 教授と共同で進めている実験を紹介する。以前の研究[9-11]から血小板細胞表層のインテグリン  $\alpha_{IIb}\beta_3$  が Outside-In シグナルを伝えるヘパリンレセプターであること、またヘパリン中のある特定の二糖構造(GlcNA6S-IdoA2S と略)がヘパリンの結合部位であることがわかっていたので、次にシュガーチップを用いてインテグリン  $\alpha_{IIb}$  分子のそれぞれのドメインのヘパリン結合性を解析した(図 6)。すなわち、ヘパリンチップおよびヘパリン部分構造二糖(GlcNA6S-IdoA2S)チップを用いて、インテグリン  $\alpha_{IIb}$  分子の 3つの部分リコンビナント蛋白質を調べた。その結果、アミノ酸一次配列からヘパリン結合ドメインであると考えられてきた region 2 にはヘパリンやその部分構造二糖に対する結合性はなく、ヘッジと称されインテグリン  $\beta_3$  と会合体を形成する region 1 にヘパリンに対する高親和性部分が、region 3 に低親和性部分があることが明らかとなった。





このような血液中の血小板等の血液凝固に関係する細胞や蛋白質とヘパリンとの相互作用研究は引き続き行っており、それに基づく血中ヘパリン濃度の簡便迅速定量といった検査方法の開発に導く予定である。



### 3. スクリーニング用 SPR イメージングへの応用と糖尿病合併症診断の試み

ある蛋白質の糖鎖結合パターンをスクリーニングすること、並びに患者血清などの蛋白質混合物の糖鎖結合パターンを簡便に調べることを目的とし、上記で調製したリガンド複合体を SPR イメージング用のチップ作成に応用した。このチップは、約1マイクロリッターの溶液を金チップ上へスポットして作成し、一枚のチップに最大96個のオリゴ糖鎖をリガンドとして固定できる。コントロールとして用いた蛋白質（コンカナバリン A）は、従来の SPR を用いた測定と同様な濃度依存性の結合特性を示した（図7）。また、他の既知の糖鎖結合性も従来の SPR と同様であった（図8）。これらの結果に基づき、SPR イメージング用チップを糖尿病患者の病状診断へ応用する検討を始めた。すなわち、東北大学医学部病院に来院される糖尿病患者の血清を、その病状（合併症の有無と種類）によって分類し、約20種類の糖鎖を固定化したチップを用いて、それら血清の糖鎖結合パターンを調べた。詳細は東北大学の片桐教授の報告書を参照いただきたいが、特定の糖鎖への結合が観測されているが、糖鎖の種類および検体数が不十分であるので、さらに検討を続けている。

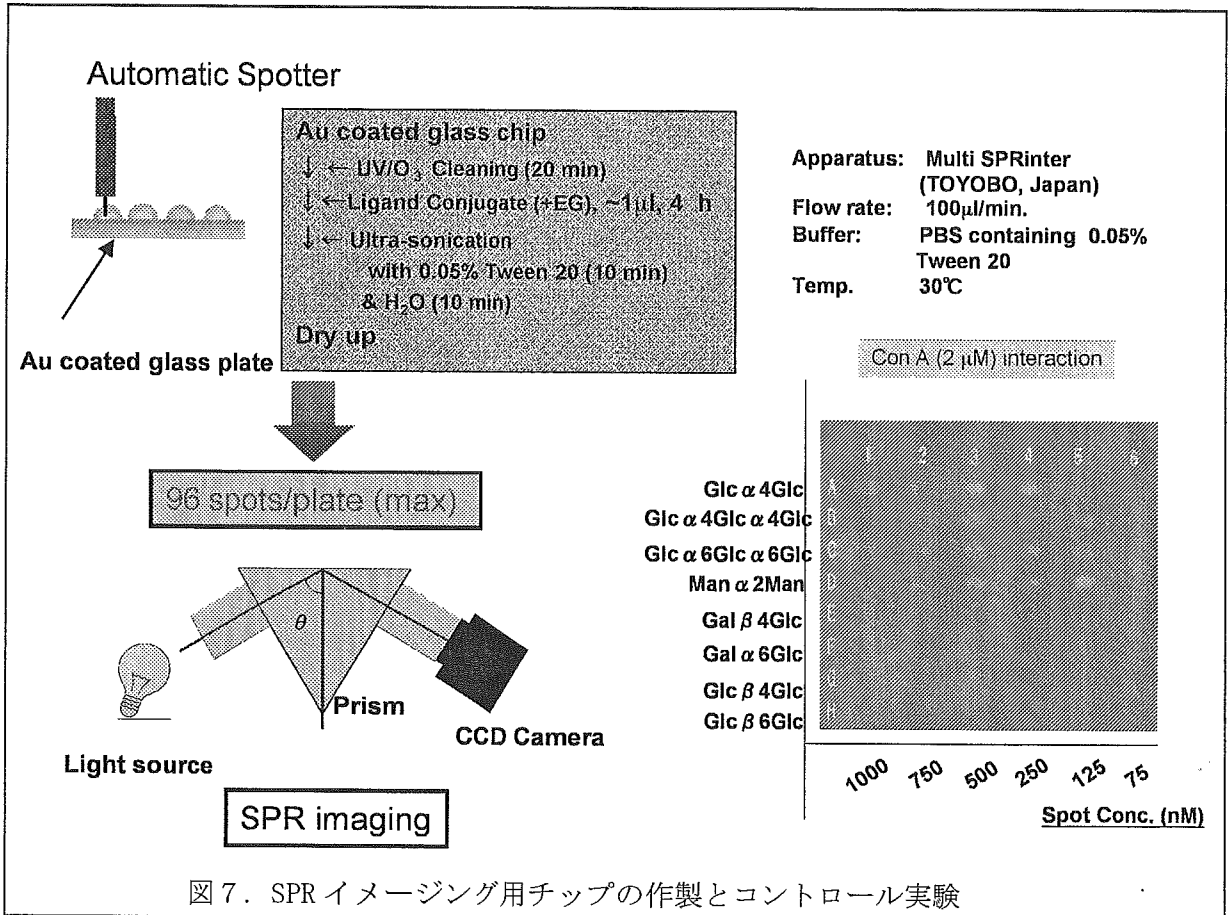


図7. SPR イメージング用チップの作製とコントロール実験

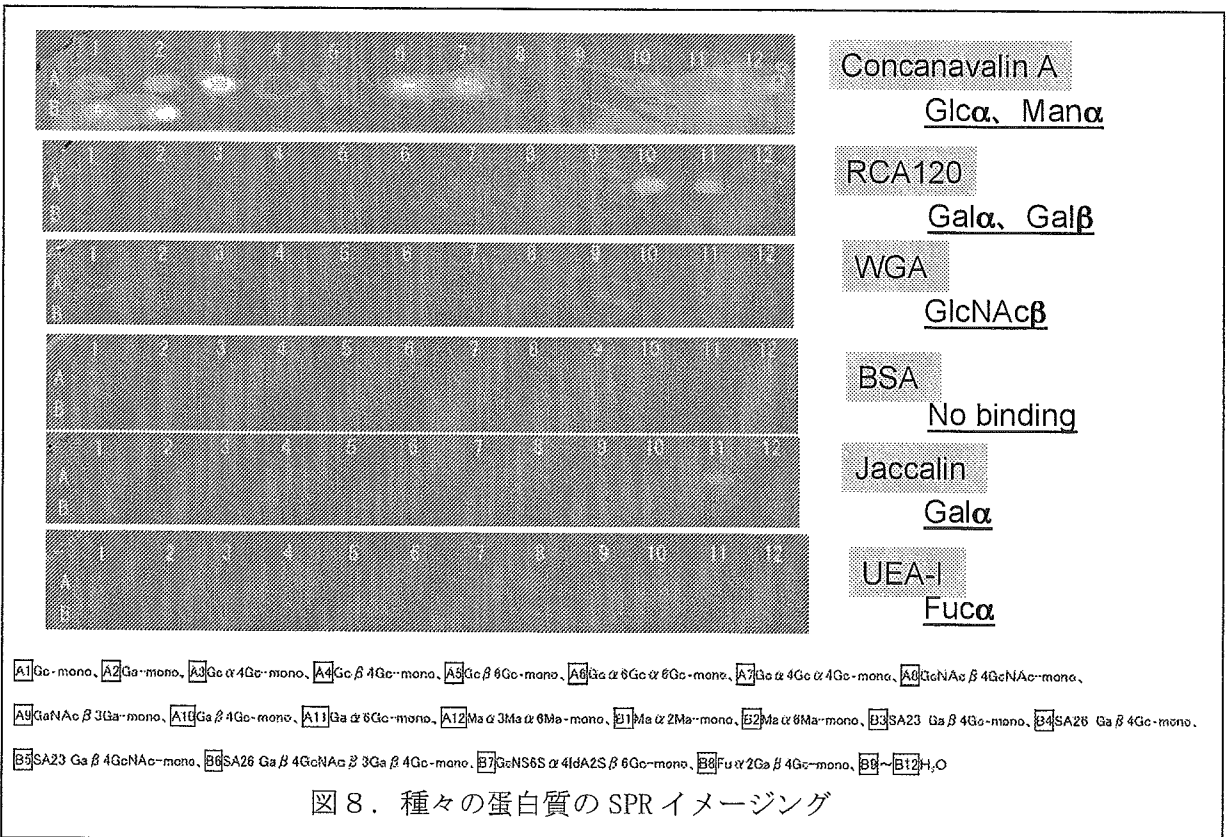
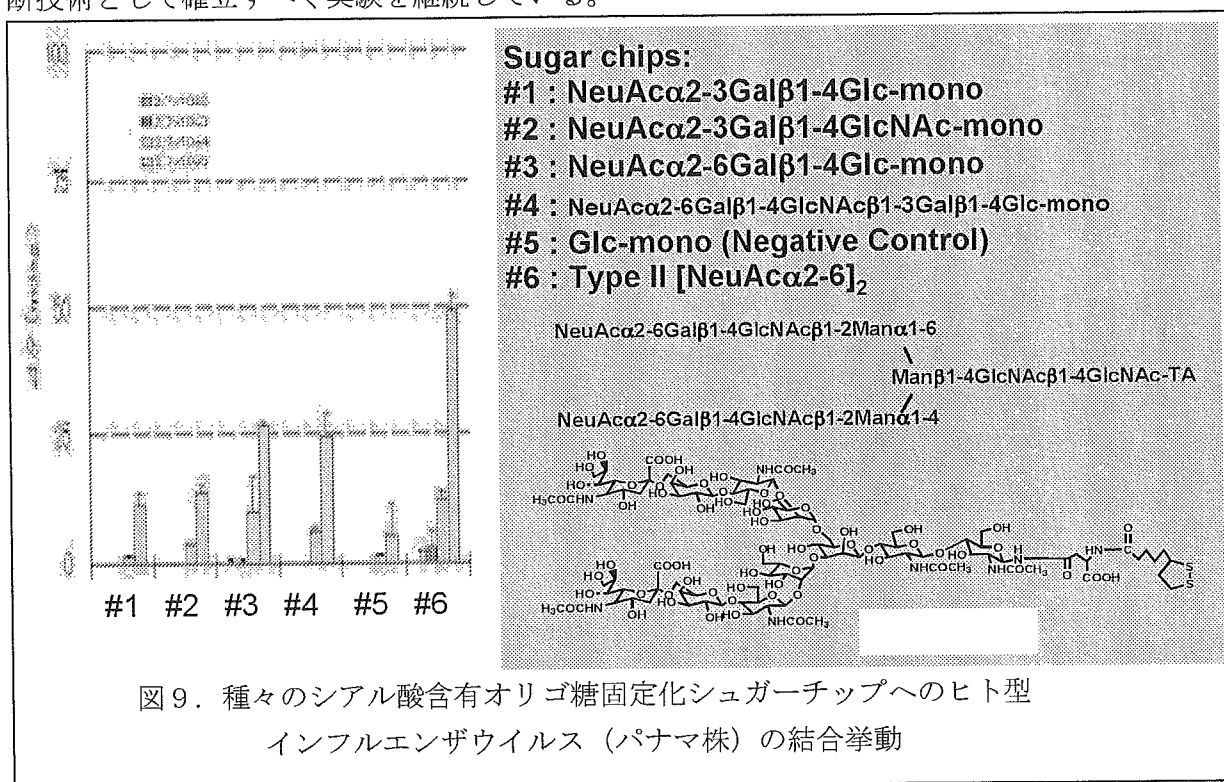


図8. 種々の蛋白質の SPR イメージング

#### 4. インフルエンザウイルス株のシュガーチップへの特異的結合

A型インフルエンザウイルスは極めて変異しやすく、時として世界的な大流行を引き起こすため、ワクチンや抗ウイルス剤などの薬剤の供給不足が懸念されている。したがって、インフルエンザの早期診断法やインフルエンザウイルス種の迅速な識別法の開発は重要な課題である。特に最近のトリ型インフルエンザウイルスの蔓延から、ヒト型とトリ型を迅速に区別し同定することは非常に重要である。この区別、さらにインフルエンザウイルス株の分別用のツールとして、種々のシアル酸含有オリゴ糖鎖を固定化したチップを作成した。図9に例を示す。詳細は奥野助教授の報告を参照いただきたいが、ヒト型インフルエンザウイルス株であるパナマ株は、NeuAc $\alpha$ 2-6構造を有するオリゴ糖により強く結合していることがわかる。現在さらに多くの種類のシアル酸含有オリゴ糖固定化シュガーチップを用いて、種々の株の結合特性を調べ、診断技術として確立すべく実験を継続している。



#### 5. SGNP

特にインフルエンザウイルス株の同定などは、on-site (ベッドサイドなどのサンプル収集場所)で行うことが望ましい。そこで、我々が調製したリガンド複合体が金と結合しやすいことを利用して、糖鎖固定化金ナノ粒子 (SGNP と総称)を開発した。図10にその調製法と、吸収スペクトルを示す。SGNPは520 nm付近に吸収極大を持つ紫色の溶液として得られ、凍結乾燥によっても変性しないきわめて安定なナノ粒子であった。その粒径は図11の透過型電子顕微鏡 (TEM) イメージに示すように比較的揃っており、約2-10 nmのサイズであった。