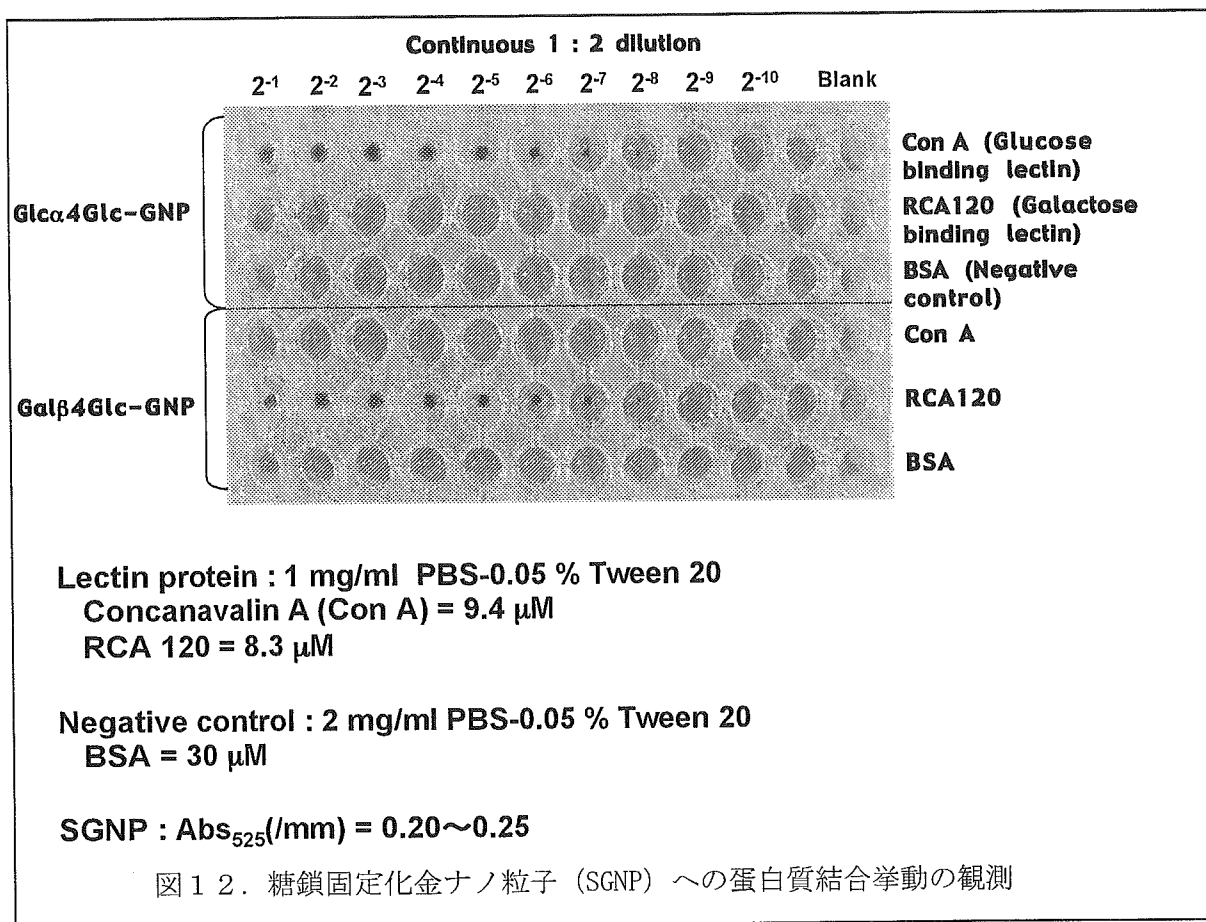


調製する際の濃度や粒径から約 8 個の糖鎖によって金ナノ粒子が覆われていることが示唆された。モデル実験として、糖鎖結合蛋白質の結合挙動を図 1 2 に示す。既知の糖鎖結合特性によって、SGNP が濃度依存的に凝集し、その変化は可視で観察可能であった。勿論吸収スペクトルを用いれば、解離常数などの結合パラメーターも算出できる。現在、シアル酸含有オリゴ糖鎖を固定化した SGNP を用いて、インフルエンザウイルスの同定を行っている。



6. SPR/MS連続分析

我々の技術は、糖鎖結合性の蛋白質などを標識することなく、その結合度を測定できるところに特徴がある。すなわち、蛋白質の種類がわからなくても結合挙動を知ることができる。そのような未知の蛋白質を質量分析 (MS) によって同定することを目標として、研究を行った。図 1 3 には、SPRに用いたチップを洗浄後そのまま使用したMS測定例を示す。すなわち、 β GlcNAc を固定化しているシュガーチップでSPRによって3種類の蛋白質の混合物の結合挙動を観測し、その後洗浄して、そのチップに GlcNAc を含むマトリックス溶液をかけ、そのまま質量分析計に入れて MALDI-TOF/MS に供した。3種の蛋白質の混合物のうち GlcNAc に結合することが知られている蛋白質 (WGA) のみの分子質量が観測され、選択的な結合特性と質量分析による同定が可能であることがわかった。現在、シュガーチップ上での蛋白質の酵素分解と、分解ペプチドの MS/MS によるアミノ酸シーケンス解析を行い、SPR/MS連続分析による蛋白質同定法を完成させようとしている。

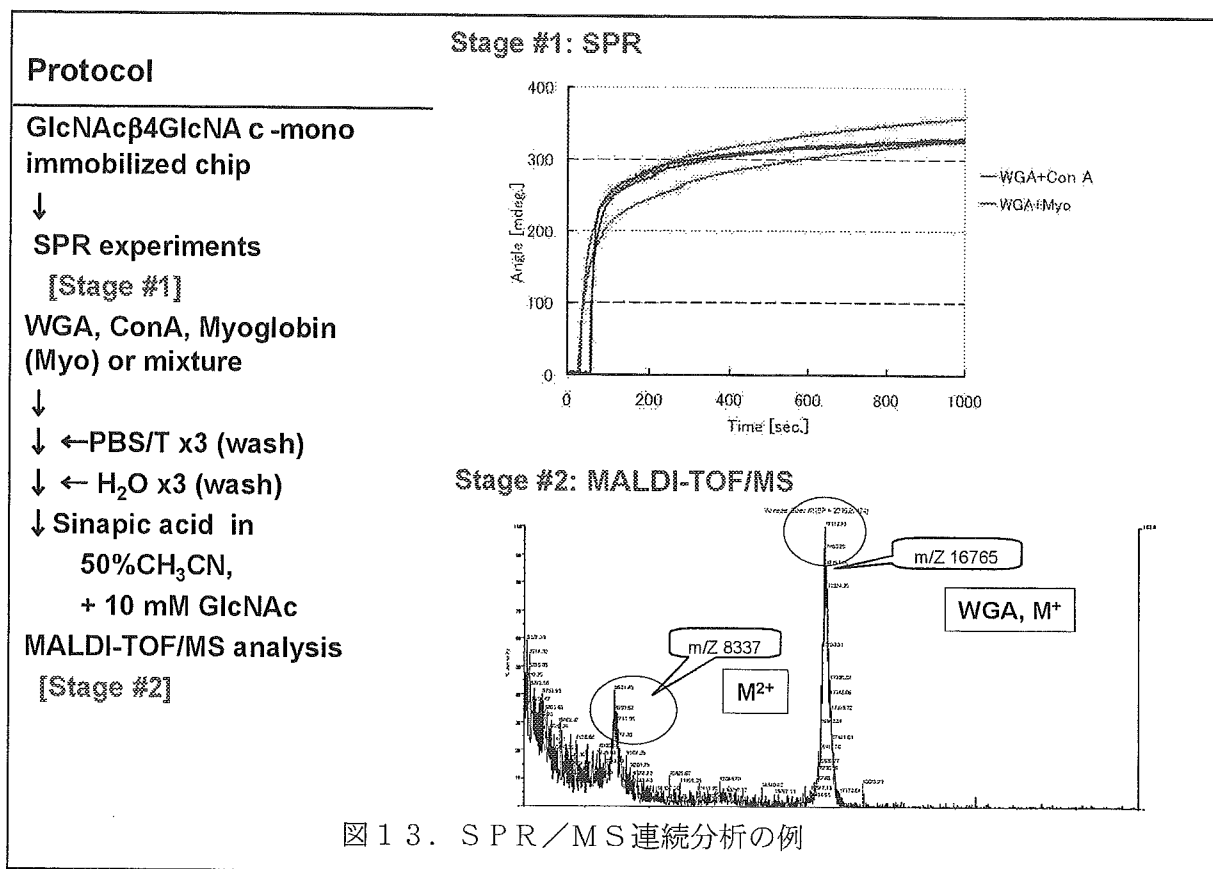


図 13. SPR/MS 連続分析の例

7. 参考文献など

- [1] Varki, A.(1999) in *Essentials of Glycobiology*, (Eds.: Varki, A., Cummings, R., Esko, J., Freeze, H., Hart, G., and Marth, J.), Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York, NY, pp. 57-68, and references therein.
- [2] Suda, Y., Nishimura, T., Kishimoto, Y., Yamashita, S., Sato, M., Uetani, M., Hamamatsu, M., Saito, A., Wakao, M., Murray-Wijelath, J., Wijelath, E., Strand, K., Sobel, M. (2005) Advanced analytical systems for the binding interaction of structurally defined oligosaccharides with proteins/cells: use of surface plasmon resonance (SPR) or gold nanoparticles (GNP), *Glycoconjugates J.* 22, 201.
- [3] 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 (要旨集)、(2005) 30.
- [4] 隅田泰生、荒野明男、楠本正一、マイケルソベール、リンカー化合物及びリガンド、並びにそれらの製造方法、特開 2004-155762、WO 2004/022565 A1
- [5] 隅田泰生、荒野明男、林秀樹、楠本正一、マイケルソベール、多岐用途型リンカー化合物及びリガンド、並びにそれらの製造方法、特開 2004-157108、WO 2004/022583 A1
- [6] 隅田泰生、楠本正一、荒野明男、リンカー化合物およびリガンド並びにオリゴ糖鎖の固定化方法および蛋白質分析用の支持体、特開 2003-83969
- [7] 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

- [8] Koshida,S., Suda,Y., Sobel,M., Kusumoto,S. (2001) An Efficient Method for the Assembly of Sulfated Oligosaccharides Using Reductive Amination. *Tetrahedron Lett.* 42, 1293
- [9] Koshida,S., Suda,Y., Sobel, M., Kusumoto,S. (2001) Synthesis of Oligomeric Assemblies of a Platelet-Binding Key Disaccharide in Heparin and Their Biological Activities, *Tetrahedron Lett.* 42, 1289
- [10] Sobel, M., Fish,W.R., Toma,N., Luo,S., Bird,K.E., Mori, K., Kusumoto, S., Blystone S.D., Suda,Y. (2000) Heparin Modulates Integrin Function in Human Platelets. *J. Vascular Surgery*, 33, 587
- [11] Suda,Y., Koshida,S., Kimura,K., Fukase, K., Kusumoto,S., Marques, D., Bird, K.,Sobel, M. (1996) Analysis of Heparin-Platelet Interaction at the Molecular Level. *Polym. Preprints*,37, 151

8. 今年度の業績

8-1. 発表論文、著書

- 1) 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
- 2) 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
- 3) 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

8-2. 学会等発表

- 1) 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
- 2) 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
- 3) 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
- 4) 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
- 5) 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
- 6) 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
 - 7) 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」、Pacifichem 2005 (Program # 898)、アメリカ ハワイ州ホノルル、2005年12月19日
 - 8) 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」、Pacifichem 2005 (Program # 1005)、アメリカ ハワイ州ホノルル、2005年12月20日
 - 9) 斎藤彰寛、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
 - 10) 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
 - 11) 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
 - 12) 若尾雅広、小川智央、鈴木啓悟、名荷谷徹、牟田健一、斎藤敦、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

8-3. 特許

- 1) 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
- 2) 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、出願日：2006年3月10日

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年度分担研究報告書

プリオン蛋白質とヘパリン部分構造との相互作用

分担研究者 堂浦克美 東北大学大学院医学系研究科・教授

研究協力者 照屋健太 東北大学大学院医学系研究科・助手

研究要旨

リコンビナント・プリオン蛋白質の硫酸多糖体部分構造への結合を糖チップを用いた表面プラズモン共鳴で検出した。結合の定量的な解析を行い、ヘパリン部分構造とプリオン蛋白質が強い結合を持つことが示された。また、この検出系を細胞などのクルードな試料に応用する際の問題点について検討した。

A. 研究目的

これまで我々は、プリオン病の予防や治療を最終的な目標として、プリオン病感染マウスや培養神経細胞を用いた薬剤スクリーニングを実施してきた(参考文献 1)。その結果、硫酸多糖類が薬効のある化合物群の一つとして有用であることを見いだした。中でも、ペントサンポリサルフェートは実際にヒトのプリオン病であるクロイツフェルト・ヤコブ病に応用され、脳室内投与療法により臨床研究が現在進行しているところである(参考文献 2)。しかしながら、プリオン病に対する薬効の作用機序は十分には明らかにされていない。硫酸多糖類は様々な部分構造と分子量分布を含む高分子であり、プリオン蛋白質との結合は定性的な評価に限られている。

その一方で、これまでに我々が利用

している抗プリオン病薬剤スクリーニング系に表面プラズモン共鳴を検出部として導入することによって、薬剤スクリーニングの効率化と定量化を図ることが期待できる。また感染因子、異常型プリオン蛋白質の検査への応用が期待される。このことは、増幅して検査できる他の感染因子とはことなり、異常型の蛋白質を検出しなければならないプリオン病において、検出感度の向上は重要な意味を含んでいる。

以上のことから糖チップを用いた表面プラズモン共鳴は、プリオン病薬剤研究に大きく応用できると考えられる。その応用の最初のステップとして、プリオン蛋白質が糖チップ上で検出されるかどうか、どのような部分構造とどのくらいの結合定数で結合するのか、また、チップ上で異常型プリオン蛋白質と正常型プリオン蛋白質とを分離で

きるかどうか。以上の二点を確かめることとし、以下の実験を行った。

B. 研究方法

ヘパリン、ヘパリンの代表的部分構造の二糖類、グルコースの各々を、チオール基で金表面に固定化した都合三種類の糖チップの供与を主任研究者からうけた。リコンビナント・プリオン蛋白質(マウスの配列、23-231)は大腸菌を宿主として産出させ、最終的に液体クロマトカラムによって精製した。細胞溶解液はプリオン感染、非感染によらず、N2a細胞(mouse neuro blastoma由来)を用いた。糖チップ上への分子の結合は、簡易型 SPR 測定装置(モリテックス社 NanoSensor)を用い、共鳴プラズモン効果の共鳴角の変化を指標として追跡した。得られたセンサーグラムを 1:1 の化学量論比での結合を仮定して解析し、見た目の解離定数($K(\text{app})$)を算出した。リコンビナント・プリオン蛋白質や、細胞溶解液を糖チップに結合させた後、過剰分を洗浄後、異なるバッファーや、各種分解酵素を添加した時のセンサーグラムの変化から、結合分子の推定を行った。

(倫理面への配慮)

倫理面に配慮する実験を含んでいない。

C. 研究結果

リコンビナント・プリオン蛋白質を用いた場合以下の結果が得られた。検討した糖チップ上の化合物の中で、ヘパリンとグルコースには、明確な結合

を示すセンサーグラムは得られなかった。その一方で、ヘパリンの代表的部分構造の二糖が固定されたチップに対しては、大きなセンサーグラムの経時変化が観測された。プリオン蛋白質の濃度を振って、解離定数を見積もったところ数 μM の強い結合であることがわかった。このセンサーグラムの変化が、プリオン蛋白質の結合に依るものかどうかを検定するために、結合した状態でトリプシンを添加したところ、結合分子の減少を示すセンサーグラムが得られた。解離したペプチド断片を回収し質量分析にて解析し、検索をかけたところ、プリオン蛋白質が検索のトップに該当した。プリオン蛋白質のヘパリンの代表的部分構造の二糖への結合は、高い塩強度においても認められた。一般にプリオン蛋白質が正常型か異常型かを生化学的に区別する際には、プロテアーゼの抵抗性を指標とする。そこで、上のアッセイに用いられる蛋白質分解酵素を用いて同様の実験を行い、分解の様子をモニターした。センサーグラムを一次の減衰曲線と仮定してリコンビナント・プリオン蛋白質の見た目の被加水分解速度を算出した。

一方、培養神経細胞の溶解液を添加した場合にも大きなセンサーグラムの変化が観測された。しかしながら、この変化はリコンビナント・プリオン蛋白質の場合とは異なり、ヘパリン、ヘパリンの代表的部分構造の二糖が各々固定された糖チップに対してみられた。

糖チップ上の過剰な結合分子を洗浄した後、リパーゼを添加した場合には急激なセンサーグラムの低下がみられ、ほぼ結合以前のベースラインにまでその強度は落ちた。蛋白質加水分解酵素を添加した場合には、このようなセンサーグラムの変化はみられなかった。培養神経細胞の溶解液を用いた上記一連の糖チップ上での操作に対するセンサーグラムの挙動は、プリオン感染細胞・非感染細胞の両者において、差がみられなかった。

D. 考察

プリオン蛋白質とヘパリンの結合において、代表的部分構造の二糖が重要な働きをしていることが判明した。この結果は、プリオン感染培養神経細胞を用いて実施したヘパリンとその誘導体のプリオン病への薬効試験の結果の解釈と符合する。即ち、ヘパリンは、プリオン病感染細胞に薬効を示すが、上記の二糖の構造を破壊する処理をヘパリンに施すとその薬効は失われる。これらの結果は、ヘパリン代表的部分構造の二糖が抗プリオン病薬剤デザインのための重要なリードに成り得ることを示している。また、プリオン病感染培養神経細胞で見られた治療効果の作用機序は、プリオン蛋白質と代表的部分構造の二糖との直接の結合であることを強く示唆するものである。これらの点を確実なものとし、薬剤開発へと展開するためには、プリオン蛋白質の結合部位の決定とヘパリン代表的部

分構造の二糖との結合の化学量論比が必要である。具体的には、プリオン蛋白質の配列の中央部には、硫酸化多糖へ結合するペプチドと相同性を示す領域が、高いスコアではないものの、存在する。プリオン蛋白質は、代表的部分構造の二糖とこの位置で結合することが推定される。この推定を検証することが、最初の課題である。

培養神経細胞溶解液を用いた実験では、プリオン感染・非感染を診断するための指標となるセンサーグラムの変化の差は確認できなかった。このことは、現時点でプリオン病の診断に糖チップを利用するのは困難であるということを示している。そこで、チップ上への結合を示す大きなセンサーグラムの変化がどのような結合分子によるものか、検証した。その結果、細胞溶解液に含まれる脂質成分がその要因であることが示唆され、蛋白質成分に関しては十分な追跡を行うことが、困難であった。このことは、脂質が細胞溶解液に含まれていると思われる糖チップに結合する蛋白質に関して、脂質がその蛋白質の糖チップへの結合を阻害している可能性を含んでいる。プリオンの感染・非感染を区別し、かつ、糖チップへの結合を阻害する物質を除去するサンプルの前処理の整備が必要である。

E. 結論

プリオン蛋白質は、ヘパリン代表的部分構造の二糖と強い結合をしめし、

薬効と関連がある。クルードな試料を用いるためには、前処理の整備が必要である。

(参考文献)

1) 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

2) 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

F. 研究発表

1. 論文発表

1) 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

2) 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

3) 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

4) 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

5) 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

6) 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

7) 坪井義夫、山田達夫、堂浦克美：プリオン病の治療－ペントサンポリサルフェート脳室内持続投与－。神経内科 63 (5) : 441-445, 2005

8) 坪井義夫、山田達夫、堂浦克美：プリオン病の治療－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方法の現状。Brain Medical. 17(3):259-264, 2005

9) 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

2. 学会発表

1) 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

2) 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

3) 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

4) 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

5) 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

6) 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

G. 知的所有権の出願・登録状況

1) 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

2) 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

3) 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

4) 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

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年度分担研究報告書

糖尿病やその合併症診療への応用

分担研究者 片桐 秀樹 東北大学大学院医学系研究科 教授

研究要旨

食生活の欧米化に伴い急増する肥満・2型糖尿病は、動脈硬化症・網膜症・腎症・神経障害といった重篤な合併症を招き、大きな社会問題となっている。これらの合併症には有効な治療法が乏しく、また、早期診断のための簡便な検査法も少ない。そこで、我々は、肥満・糖尿病の機序の解明と治療法の開発、合併症発症の機序の解明と早期診断法・根治治療法の開発の2つを目標として、本研究を進めている。1. 肥満・糖尿病については、動物実験により肥満時の食欲調節障害の機序を解明し、食欲の制御による新規治療ターゲットを見出した。レプチンは脂肪組織から分泌され、食欲の抑制に働くホルモンであるが、肥満になると脳・視床下部におけるレプチンの感受性が低下し、食欲にブレーキがかからなくなる。この「レプチン抵抗性」と呼ばれる現象が、肥満を維持し増悪させる重要なメカニズムである。本研究では、脂肪組織発の神経シグナルが、視床下部におけるレプチン抵抗性を調節し、その活性化で過食・糖尿病が改善することを証明した。この発見は、肥満やその合併症を総じて治療する薬剤・手法の開発につながるものと考えられる。2. 糖尿病性合併症に関しては、実際の患者血清を用いて、シュガーチップによる糖鎖結合蛋白の網羅的な解析を行っている。23名の糖尿病患者をそれぞれの合併症の有無で分類し、その血清中に存在する糖鎖結合蛋白を網羅的にスクリーニングしたところ、網膜症・動脈硬化症の患者で、血清中糖鎖結合蛋白の種類・濃度が増える傾向を示した。今後は、さらに症例数を増やすとともに、これらの蛋白の同定や動物実験での意義付けの検討を行う予定である。

A. 研究目的

近年、過食などの生活習慣の欧米化により、肥満に基づく糖尿病患者の増加が社会的な問題になっている。肥満になると、インスリン抵抗性が惹起される（メタボリックシンドローム）のみならず、レプチン抵抗性により食欲に制御がかかりにくくなり、更なる肥満の増悪を招く。これらは悪循環を形成して、肥満・糖尿病は悪化の一途をたどる。この病態は、動脈硬化症や糖尿病性細小血管合併症（網膜症・腎症・神経障害）の発症につながることで知られており、これらの患者の急激な増加は、医療的にも経済的にも大きな問題を引き起こしている。しかし、これらの合併症については、発症機序も明らかではなく、有効な治療法も乏しいのが現状である。さらに、網膜症や神経障害・動脈硬化症については、簡便な早期診断法はなく、眼底検査や神経伝導速度検査・血管造影法など、比較的手間のかかる検査が必要であるため、糖尿病のような莫大な数の患者のスクリーニングには全く適さない。このことも、合併症の診断を遅らせ、重篤な合併症患者の増加につながっている。

最近になって、膵β細胞におけるGLUT2糖輸送担体蛋白の糖鎖修飾が肥満状態で変化し、インスリン分泌障害に関与することが報告された。また、血管内皮細胞における糖鎖修飾の変化と動脈硬化症

との関連も指摘されている。これらの報告は、糖尿病やその合併症の発症に蛋白の糖鎖修飾の変化（異常）が関わっている可能性を示すものである。

そこで、本研究では、1. 肥満の発症機序を解明し、新規治療法の開発につなげる。2. 蛋白の糖鎖修飾に対する結合蛋白の有無・変化を病態ごとに検討し、肥満や糖尿病・メタボリックシンドロームおよび、その合併症（網膜症・腎症・神経障害）の発症機序の解明及び早期診断の簡便な検査法の開発、さらには、新規治療法の開発につなげることを目的とする。

B. 研究方法

1. モデルマウスを用いて、遺伝子治療によるその改善効果を検討し、肥満・糖尿病の発症機序の解明や治療法開発につなげる。高脂肪食負荷により、肥満・糖尿病を発症させたマウスの腹腔内脂肪組織に、アデノウィルスを用いて、ミトコンドリアでのATP産生を抑制し基礎代謝を亢進させる働きがあるUCP1遺伝子を後天的に発現させ、腹腔内脂肪組織における代謝亢進による食欲や全身の糖・脂質代謝への影響を観察する。
2. 東北大学病院糖尿病代謝科に通院中の糖尿病患者から血清を採取し、シュガーチップを用いて、血清中に存在する糖鎖結合蛋白を検討する。網膜症

・腎症・神経障害・動脈硬化症の有無・進展度により、糖鎖結合蛋白の変化を見出し、この変化した結合蛋白を解析することで、合併症の発症機序の解明及び早期発見のための検査法の開発を試みる。

3. 倫理面への配慮

本研究における動物実験は、東北大学動物実験指針に基づいて実施し、東北大学大学院医学系研究科動物実験委員会の承認を受けている。また、患者サンプルを用いた検討については、「糖尿病合併症と糖鎖結合蛋白における臨床研究」として、東北大学医学部・医学系研究科倫理委員会にて承認を受けている。

C. 研究結果

1. モデルマウスを用いた肥満・糖尿病の発症機序の解明

食事性肥満・糖尿病モデルマウスの腹腔内脂肪組織（精巣上体脂肪）へ、アデノウィルスを用いて、UCP1の遺伝子導入を行ったところ、その発現は、精巣上体脂肪組織の脂肪細胞の5%不足と、極めて限定的であり、全身の基礎代謝量に影響を与えるほどではなかった。しかし、糖代謝・インスリン感受性・レプチン感受性に与える影響は多大なものであった。

まず、高脂肪食負荷により惹起された糖尿病やインスリン抵抗性の著明な改善が観察された。さらに興味深いことに、血中レプチン濃度は約50%に低下し、摂食量は約60%に減少した。レプチンは、視床下部に働き食欲を抑制する働きのあるアディポサイトカインであるため、このレプチンと摂食の協調的な低下は、視床下部におけるレプチンの感受性が亢進したことを意味する。実際、レプチン負荷試験にて、著明なレプチン感受性の亢進が直接証明され、また、視床下部では、食欲促進ペプチドであるNPYの発現の著明な減少が観察された。これらから、腹腔内脂肪のごく一部の細胞における代謝の亢進により、食事性肥満に伴うレプチン抵抗性が解除されたことが示された。

次に、この摂食量減少、つまり、レプチン抵抗性改善の機序の解明を試みた。この腹腔内脂肪（精巣上体脂肪）組織近傍でその脂肪組織につながる神経を切断し、その後に遺伝子導入を行う手法を用いて、神経シグナルの関与を検討したところ、興味深いことに、神経切断は、インスリン抵抗性解除の効果には影響しなかったが、レプチン抵抗性解除効果は、ほぼ完全に抑制された。上行神経を遮断するカプサイシン投与にても同様の結果が認められ、腹腔内脂肪組織での代謝が活発となった際に発せられるインスリン抵抗性改善とレプチン抵抗性改善のシグナルは、別々の経路で伝わ

っていること、特にレプチン抵抗性改善には神経系が関わっていることが示された。

2. 糖尿病患者における糖鎖結合蛋白の変化の検討

まず、東北大学医学部・医学系研究科倫理委員会にて、患者血清を用いる本研究の承認を得、これに基づき、検討を行った。現在のところ、東北大学病院糖尿病代謝科通院中の糖尿病患者23名（重症網膜症7名、重症神経障害5名、重症動脈硬化症6名、これらの合併症を認めない者5名）から血清を採取し、シュガーチップを用いて糖鎖結合蛋白のパターン検討を終了した。合併症を持たない糖尿病患者に比べ、網膜症・動脈硬化症を発症した患者の血清には、多くの糖鎖結合蛋白質が存在する傾向を認めた。

＜シュガーチップ解析の実際例＞

上から合併症なし、動脈硬化症症例、網膜症症例の一例

No.12 Serum		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
10000倍	A	[Image]											
	B	[Image]											
1000倍	A	[Image]											
	B	[Image]											
100倍	A	[Image]											
	B	[Image]											
10倍	A	[Image]											
	B	[Image]											

No.17 Serum		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
10000倍	A	[Image]											
	B	[Image]											
1000倍	A	[Image]											
	B	[Image]											
100倍	A	[Image]											
	B	[Image]											
10倍	A	[Image]											
	B	[Image]											

No.19 Serum		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
10000倍	A	[Image]											
	B	[Image]											
1000倍	A	[Image]											
	B	[Image]											
100倍	A	[Image]											
	B	[Image]											
10倍	A	[Image]											
	B	[Image]											

D. 考察

肥満・メタボリックシンドロームの病態として、インスリン抵抗性とレプチン抵抗性が重要な役割を果たしていることが知られている。インスリン抵抗性は、肥満に基づく糖尿病・高脂血症・高血圧や動脈硬化症の基盤である一方、レプチン抵抗性は、肥満自体の維持・悪化の原因として重要である。多くの肥満患者では血中レプチン濃度は増加しているにもかかわらず、視床下部におけるレプチンの作用が低下しているため、食欲の抑制が効かないというわけである。そこで、レプチン抵抗性を改善させることができれば、肥満自体が改善し、肥満に基づく種々の病態（メタボリックシ

ンドローム)をまとめて治療することが可能であると
考えられる。

本研究では、局所の脂肪組織の一部の細胞への遺伝子導入により、著明なインスリン抵抗性の改善、レプチン抵抗性の改善を認めたことから、遺伝子導入され代謝が活発となった細胞から発せられるこれらの病態に対する改善シグナルが存在することが示唆された。さらに、神経切断や薬物による遮断の実験から、レプチン抵抗性改善シグナルは神経系を介していること、インスリン抵抗性改善シグナルはこの神経経路を介していないことが示された。本研究で示された食欲を統御する脂肪組織発の神経シグナルは、世界初の発見であり、生物学的意義は多大であるのみならず、このシグナルがレプチン感受性に関与していることから、肥満における病態の解明に点からも意義深い。さらに重要なことは、本研究で得られた結果のように、この神経経路を活性化させることにより、レプチン抵抗性が改善され肥満の根本治療につなげることができると考えられ、全く新しい視点からの治療法開発につながることを期待されることである。

本研究は、Cell Metabolism誌に掲載され、その号の featured previewにも紹介され、その意義が高く評価された。また、新聞・テレビ・ラジオ等、マスメディアに大きく取り上げられ、話題となっている。今後は、この神経シグナルの詳細・分子機序を解明し、この系を活性化する薬剤や手法の開発につなげるべく、この研究を発展させたい。

また、糖鎖修飾の病態における関与はさまざまな疾患で証明されつつあり、糖尿病やその合併症でも報告されつつある極めてホットな分野である。今回の我々の検討においても、実際の糖尿病合併症患者の血清において糖鎖結合蛋白に変化が見られる傾向を認めており、全く未知の合併症発症機序の解明や新規の簡便な診断法の開発につながる可能性が考えられる。今後は、まず、症例数を増やし、有意な結合蛋白を同定すること、動物実験において、糖尿病、糖尿病性細小血管合併症・動脈硬化症・レプチン抵抗性などの病態とこれらの糖鎖修飾結合蛋白の変化との因果関係を明らかにすることを先行し、新規の簡便な診断法の開発につなげたい。さらに、病態を明らかにすることで、患者数が急増しているにもかかわらず有効な治療法のないこれらの疾患に対して、糖鎖修飾やその結合蛋白をターゲットとした新規治療法の開発の可能性を模索したい。この分野の糖鎖研究はまだ始まったばかりであるが、それだけの可能性を内包した分野であると考えられる。

F. 研究発表

1. 論文発表

- Yamada, T., **Katagiri, H.**, Ishigaki, Y., Ogihara, T., Imai, J., Uno, K., Hasegawa, Y., Gao, J., Ishihara, H., Nijima 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, A.Y., 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.

2. 学会発表

- **片桐秀樹**、萩原健英、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 γ 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 β 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 γ 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 β 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- November17-18 2005, Sendai,

Japan

- Ogihara T., **Katagiri H.**, Hasegawa Y., Oka Y. Role of eNOS in β 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

G. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得
準備中

2. 実用新案登録
なし

3. 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プ—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

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年度分担研究報告書

シアル酸含有オリゴ糖鎖の合成

分担研究者 石田秀治 岐阜大学応用生物科学部・教授

研究要旨

シアロ糖鎖の効率的な合成法の確立を目的として研究を行った。その結果、シアリル α 2-4/8シアル酸及び α -GalNAc配糖体の合成における画期的な方法を見出した。また、従来法も応用して複雑なシアロ糖鎖の合成を達成した。

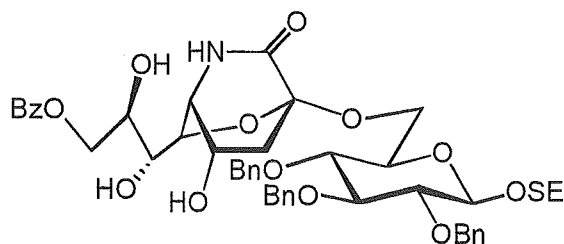
A. 研究目的

シアル酸を含む糖鎖（シアロ糖鎖）は、糖脂質ガングリオシドや糖タンパク質糖鎖として細胞表層に存在し、様々なタンパク分子との相互作用によって多彩な生体機能を発現する。しかし一般に、細胞表層にごく微量存在するガングリオシドやシアロ糖タンパク質は分子多様性の物質であり、天然から純粋な単一化合物を得ることはきわめて難しい。このことが構造と機能についての厳密な解明を阻んできた。筆者らは、この困難な問題を解決するために天然型ガングリオシドはもとより、誘導体や類縁体の系統的合成法を確立し、得られた多彩な合成標品を糖鎖プローブ（さぐり針）として用いることで、多様な糖鎖の生物機能を「分子のレベル」で解き明かし、広く医学・生物学への応用を目指している。

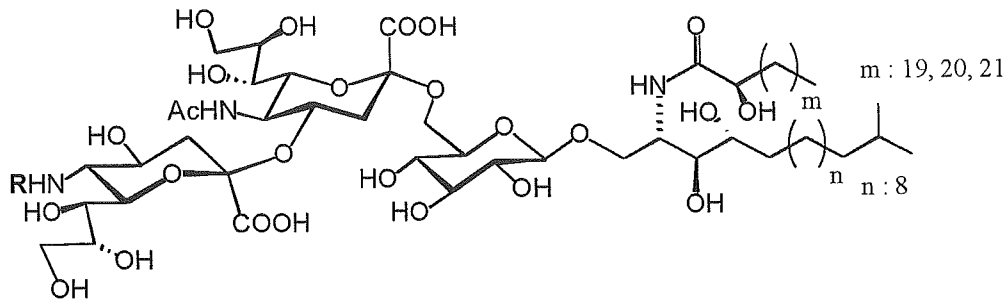
B. 研究方法

1. ラクタム化シアル酸を受容体に用いるシアル酸二量体の合成

従来、糖化学において最も困難な課題とされているシアル酸二量体の合成に取り組み、立体配座をイス型からボート型に変換した受容体（下図）を用いることで、シアリル α 2-4シアル酸及びシアリル α 2-8シアル酸の合成に成功した。

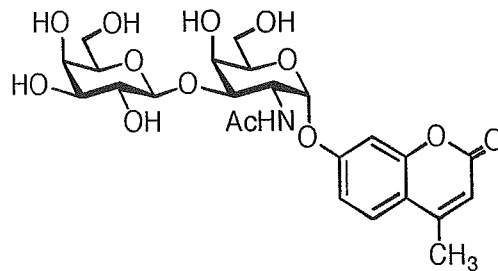


この方法を応用する事により、棘皮動物に見いだされている新しいシアロ糖鎖の合成が可能になる。(下図参照)



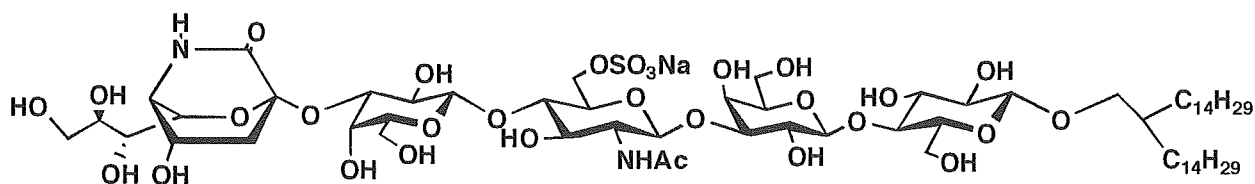
2. Endo- α -GalNAcase の高感度基質の設計と合成

本酵素は、ビフィズス菌などから発見された酵素で、糖タンパク質ムチン中の Gal β 1-3GalNAc α 1-Ser/Thr を認識して、糖鎖とペプチド間の結合を加水分解する。本研究では、本酵素の高感度基質である Gal β 1-3GalNAc α -4Mu を設計し、その合成を検討した。従来技術では、本物質の合成は困難であったが、我々が新たに見出した DTBS 効果と、Mitsunobu 反応を組み合わせることにより、効率的に達成する事が出来た。本合成法は、その他の多様なグリコシダーゼ基質の合成に応用することが可能である。

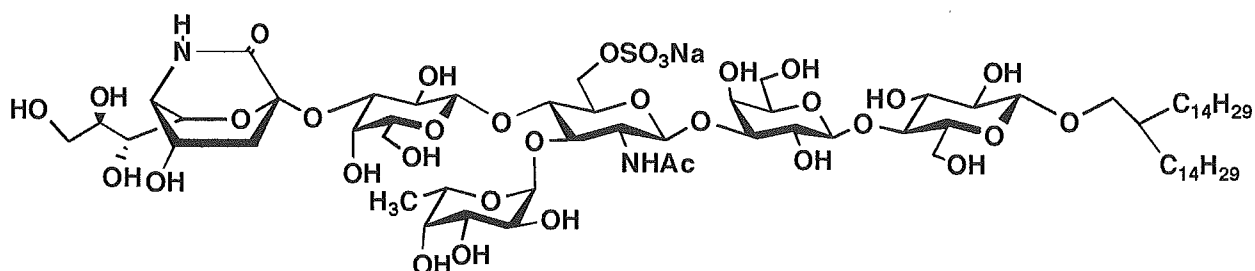


3. ラクトム型シアル酸を含有する 6-O-スルホシアリルパラグロボシド及びシアリルルイス X 糖脂質の合成

近年、N-アセチルシアル酸、N-グリコリルシアル酸とは異なる、新しいシアル酸の分子種（ラクトム型シアル酸）が見出され、ボート型構造を有するユニークな構造と、リンパ球の交通制御への関与といった生物機能の両面から注目を集めている。本研究では、N-アセチルシアル酸をラクトム型シアル酸に導く効率的な方法を開発し、それを応用して標記の二種の糖脂質の全合成を達成した。



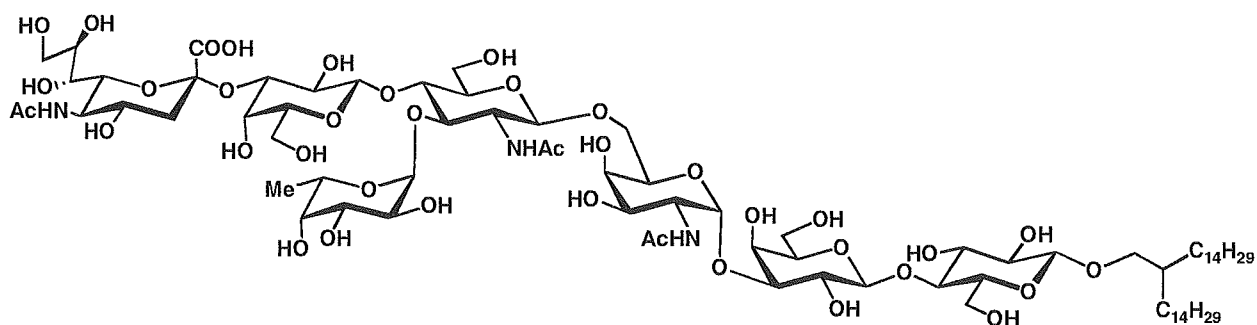
ラクタム型シアル酸を含有する 6-O-スルホシアリルパラグロボシド



ラクタム型シアル酸を含有する 6-O-スルホシアリルルイス X 糖脂質

4. シアリルルイス X 骨格を有するムチン型糖鎖糖脂質の設計と合成

細胞接着分子セレクトインのリガンドであるシアリルルイス X 糖鎖は、一方で多くのガンに見出されるガン関連抗原でもある。本研究では、肺ガン、胃ガン、大腸ガンで見出されたシアリルルイス X 含有ムチン型糖鎖に注目し、その構造をモチーフにした新たなネオ糖脂質の設計と合成を行った。適切に保護したシアリルガラクトース、グルコサミン、ガラクトサミン、ラクトースを合成ユニットに用いることで、目的とする 7 糖性糖脂質の全合成に成功した。



C. 今後の展望

本血球の成果として、シアル酸二量体構築法の開発、グリコシダーゼ高感度基質の設計と合成、複雑な構造を有するムチン型糖タンパク質糖鎖をモチーフにしたネオ糖脂質の合成を達成した。ここで確立された方法は、糖脂質型糖鎖、糖タンパク質型糖鎖の合成に広く応用することができ、今後この方法を活用して複雑な構造の糖鎖を有するシュガーチップの創製に役立てていきたい。

D. 研究発表

1. 論文発表

1) 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.

2) 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.

3) Imamura, A., Ando, H., Ishida, H. and Kiso, M.: Di-*tert*-butylsilylene(DTBS)-directed α -selective synthesis of 4-methylumbelliferyl T-antigen. *Organic Letters*, 7(20), 4415-4418, 2005.

4) 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.

2. 学会発表

1) 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)

2) 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 α -N-アセチルノイラミン酸の構造研究；Conformational Study of α -N-Acetylneuraminic Acid by Density Functional Theorey. 第25回日本糖質学会年会.(July 20-22, 2005,京都)

3) 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 α ガラクトシル化：A Novel and Highly Stereoselective α -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)

4) 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)

5) 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)

- 6) 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)
- 7) 山仲毅、井上望、今村彰宏、石田秀治、木曾真：D T B S 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)
- 8) 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)
- 9) 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)

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年度分担研究報告書

オリゴ糖を用いたウイルス感染症の診断技術の開発

分担研究者 奥野寿臣 兵庫医科大学病原微生物学・助教授

研究要旨

シアル酸を含むオリゴ糖鎖を用いて作成したシュガーチップへのインフルエンザウイルスの結合を表面プラズモン共鳴で測定したところ、Panama 株 (H3N2) は有意な結合を示したが、Okuda 株 (H2N2)、Aichi 株 (H3N2) では結合は見られなかった。同じオリゴ糖鎖で作成した金ナノ粒子とインフルエンザウイルスの結合を凝集の有無で判定したところ、どの株も凝集を示さなかった。

研究の目的

多くのウイルスは細胞表面の糖鎖分子をレセプターとして細胞に感染する。しかし、各ウイルスの糖鎖認識部位の詳細な解析はなされておらず、共通認識部位の存在も良く判っていない。また、ウイルス疾患の診断には抗原抗体反応を用いた測定法が主流であり、糖鎖を使用したものはまれであった。これらの疑問点を解決するため、各種のシアル酸を含むオリゴ糖とウイルスの親和性を測定し、その反応パターンによって各種ウイルスを区別できるか否かを調べることを試みた。

材料と方法

1.使用ウイルス：インフルエンザウイルス[A/Beijing (H1N1)、 A/Okuda/57 (H2N2)、 A/Aichi/2/68 (H3N2)、 A/Panama/2007/99 (H3N2)]

ウイルスを MDCK 細胞で増殖させ、その培養上清を 10 万 G で 1 時間超遠心後、沈渣のウイルス粒子を PBS100 μ l に溶解した。total ウイルス量は A/Beijing が 1.8×10^7 pfu、A/Okuda/57 (H2N2) が 1.7×10^7 pfu、A/Aichi/2/68 (H3N2) が 2.7×10^7 pfu、A/Panama/2007/99 (H3N2) が 4.5×10^8 pfu であった。

2.シュガーチップ：シアル酸を含む各種オリゴ糖（下記の①～⑥）を固着させ