

た基盤（シュガーチップ）を作成し、ウイルスを添加した後、その結合を表面プラズモン共鳴（Surface Plasmon Resonance、SPR）で測定した。

3.金ナノ粒子：シアル酸を含む各種オリゴ糖（下記の①③⑦⑧）を固着させた金ナノ粒子を作成し、ウイルスを添加した後、その凝集の有無を目視で判定した。

- 4.オリゴ糖鎖：
- ①NeuAc  $\alpha$  2-3Gal  $\beta$  1-4Glc-mono
  - ②NeuAc  $\alpha$  2-3Gal  $\beta$  1-4GlcNAc-mono
  - ③NeuAc  $\alpha$  2-6Gal  $\beta$  1-4Glc-mono
  - ④NeuAc  $\alpha$  2-6Gal  $\beta$  1-4GlcNAc  $\beta$  1-3Gal  $\beta$  1-4Glc-mono
  - ⑤Glc-mono（陰性コントロール）
  - ⑥Type II [NeuAc  $\alpha$  2-6]<sub>2</sub>
  - ⑦Type II NeuAc  $\alpha$  2-3Gal  $\beta$  1-4GlcNAc  $\beta$  1-6Glc-mono
  - ⑧Type II NeuAc  $\alpha$  2-3Gal  $\beta$  1-4GlcNAc  $\beta$  1-6Glc-mono

## 結果

シュガーチップを用いた場合、Panama 株（H3N2）は⑥に最も強く結合し、③④には中等度、①②には軽度反応した。Okuda 株（H2N2）、Aichi 株（H3N2）では結合は見られなかった。金ナノ粒子と各ウイルス株（Panama 株、Okuda 株、Beijing 株（H1N1））と混合しても凝集は見られなかった。

## 考察

Okuda 株が①②（2-3 結合）よりも③④⑥（2-6 結合）に強い結合を示したのは、このウイルスがヒトの細胞（シアル酸がガラクトースと 2-6 結合している）に感染することから予想されたが、他の株では反応が見られなかった。理由は不明であるが、ウイルス力価の不足が考えられる。金ナノ粒子で全く凝集が得られなかったが、これらのウイルスはニワトリ赤血球を良く凝集した。ニワトリ赤血球（数 10  $\mu$ m）と金ナノ粒子（10nm）の大きさの違いとそれに関連するウイルスと金ナノ粒子の数の相対比が原因と思われる。これらをさらに明らかにするため、力価の高い精製ウイルスを用いて解析する予定である。また、株の種類を増やしておこなって行く。

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

てんかん等の脳疾患への応用

分担研究者 加藤啓子 大阪府立大学生命環境科学研究科・助教授

## 研究要旨

申請者らは、神経回路網の変化を伴ったてんかん誘導をおこすことのできるキンドリングモデルマウスを用いて、てんかん誘導に連動する分子基盤の構築を目指してきた。本研究では、シュガーチップを用いたてんかん発症機構に関わる分子基盤の構築を目指す。本年度は、シュガーチップ上で提示する糖鎖構造の検索を行った。

### A. 研究目的

てんかんは、ヒト・ネコで1%、イヌで5-6%に発症する頻度の高い慢性神経疾患である。その原因は遺伝的素因に起因した突発性の場合と、ガン化・虚血・水頭症等も含めた二次的な素因に起因した症候性の場合によるものと、多数知られているが、根本的な障害は、神経回路網の異常な同期性放電である。最近になって、学習障害・注意欠陥多動性障害を示す児童の約50%はけいれん性疾患を持つこと、てんかん患者に学習障害・注意欠陥多動性障害合併率が高いこと(20-25%)、てんかん患者は統合失調症の発症リスクが高いこと、も知られるようになってきた。これらの知見は、てんかんという疾患が、てんかんだけにとどまらず、神経回路網障害として大きくとらえる必要性が高まっていることを示している。現在までのところ、遺伝性の突発性てんかんの原因遺伝子の解明は、飛躍的に進んできている一方で、原因遺伝子を含む神経回路網全体を注視した分子基盤の構築には至っていない。本申請者は、神経回路網の変化を伴ったてんかん誘導をおこすことのできるキンドリングモデルマウスに着目し、てんかん誘導に連動する分子群の同定及びそれら分子群のてんかん関与機構について研究を進めてきた。本研究では、てんかん発症機構に関わる分子基盤を構築する上で、シュガーチップを用いた、糖鎖及び糖鎖結合因子の同定をおこない、糖鎖を用いた神経回路網障害検査システムの開発を目指している。本年度は、シュガーチップ上で提示する糖鎖構造の検索を行った。

### B. 研究方法および結果

シュガーチップ提示糖鎖構造の検索-1

現在までに、マウス扁桃体キンドリングを作成し、行動や脳波にみられるてんかん発作の獲得過程のクライテリアを作成し、 $\alpha$ 2,3-シアル酸転移酵素(Siat4c)の発現とその酵素による糖蛋白質へのシアル酸修飾について詳細に解析した結果、扁桃体刺激は、扁桃体→海馬→視床前核→大脳皮質帯状回へと伝搬されることを分子レベルで証明していた。さらに本年度は、この Siat4c のノックアウトマウスの作成も完了し、幾つかの行動異常に加え、海馬や大脳皮質帯状回での病理変化を観察した。そこで本年度は、シュガーチップに Siat4c (ST3Gal IV) シアル酸転移酵素により修飾を受けた以下の糖鎖構造を提案した。また、提案した糖鎖構造の参考文献も同時に示す。

- ◇ NeuNAc  $\alpha$ 2-3Gal  $\beta$ 1-3GlcNAc  $\beta$ - ; type I
- ◇ NeuNAc  $\alpha$ 2-3Gal  $\beta$ 1-4GlcNAc  $\beta$ - ; type II
- ◇ NeuNAc  $\alpha$ 2-3Gal  $\beta$ 1-3GalNAc  $\beta$ - ; type III

参考文献：

1. Kono, M., Ohyama, Y., Lee, Y. C., Hamamoto, T., Kojima, N., Tsuji, S. Mouse beta-galactoside alpha 2,3-sialyltransferases: comparison of in vitro substrate specificities and tissue specific expression *Glycobiology* 7:469-479
2. Kitagawa, H., Paulson, J. C. (1994) Cloning of a novel alpha 2,3-sialyltransferase that sialylates glycoprotein and glycolipid carbohydrate groups *J Biol Chem* 269:1394-1401
3. Matsushashi, H., Horii Y., and Kato, K. (2003) Region-specific and epileptogenic-dependent expression of six subtypes of  $\alpha$ 2,3-sialyltransferase in the adult mouse brain. *J Neurochem*, 84: 53-66.
4. Okabe, A., Tawara, Y., Masa, T., Oka, T., Machida, A., Tanaka, T., Matsushashi, H., Shiosaka, S., and Kato, K. (2001) Differential expression of mRNAs for sialyltransferase isoenzymes induced in the hippocampus of mouse following kindled-seizures. *J Neurochem*, 77:1-14.

#### シュガーチップ提示糖鎖構造の検索—2

てんかん誘導に連動する分子群をさらに網羅するため、キンドリングモデルマウスのジーンチップアレイ（アフィメトリクス社製 39,000 遺伝子）を実施した。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、海馬を抽出し、それぞれの mRNA を調整後実施した。その結果、細胞外、細胞膜の分子群、代謝、核内分子群等、様々な遺伝子発現の増減が神経領域特異的に見つかってきた。その中でも特に糖及び糖鎖の代謝系の著しい変動を観察した。

第一に、Siat4c がてんかん獲得後に発現変動を示したのと対照的に、Fut4 は、てんかん獲得途中のステージ3において発現変動を示した。また、Siat4c と Fut4 は共に Galactose の3位にシアル酸あるいはフコースを付加するものであることから、Siat4c と Fut4 の発現に何らかの関連性を示唆する。そこで、本研究におけるシュガーチップでは、Siat4c シアル酸転移酵素に加え、Fut4 フコース転移酵素により生合成された糖鎖構造も提案した。

- ◇ Gal  $\beta$  1-4(Fuc  $\alpha$  1,3)GlcNAc  $\beta$  -
- ◇ NeuNAc  $\alpha$  2-3Gal  $\beta$  1-4(Fuc  $\alpha$  1,3)GlcNAc  $\beta$  -
- ◇ Fuc  $\alpha$  1-2Gal  $\beta$  1-4(Fuc  $\alpha$  1,3)GlcNAc  $\beta$  -

参考文献：

1. Azuma Y, Ito M, Taniguchi A, Matsumoto K (2004) Expression of cell surface Lewis X and Y antigens and FUT4 mRNA is increased in Jurkat cells undergoing apoptosis. *Biochim Biophys Acta*. 2004 Jun 11;1672(3):157-63.
2. Martinez M, Joffraud M, Giraud S, Baisse B, Bernimoulin MP, Schapira M, Spertini O. (2005) Regulation of PSGL-1 interactions with L-selectin, P-selectin, and E-selectin: role of human fucosyltransferase-IV and -VII. *J Biol Chem*. 2005 Feb 18;280(7):5378-90. Epub 2004 Dec 3.

### シュガーチップ提示糖鎖構造の検索—3

キンドリングモデルマウスのジーンチップアレイの結果より、てんかん誘導に連動した発現変動を示す4種の内在性レクチンを同定した。そこで、各レクチンに対応する糖鎖構造を特定し、シュガーチップ上で提示できる糖鎖構造を提案した。

1. Clec1a: キンドリング後海馬で1.7倍発現上昇。

認識する糖鎖構造は、不明。

2. Clec3b (tetranectin): キンドリング後視床で、3.5倍発現上昇。

Ca<sup>2+</sup>に結合。Ca<sup>2+</sup>非依存的に Heparin と結合する。

参考文献：Zelensky AN, Gready JE. The C-type lectin-like domain superfamily. *FEBS J*. 2005 Dec;272(24):6179-217. Review.

3. Clec7a: 刺激の途中、海馬で 1/32 発現減少。

Non calcium binding type;  $\beta$  glucan receptor として同定されたもの。Laminarin (linear 1,3- and 1,6- $\beta$ -glucan), SPG (1,6-monoglucosyl-branched 1,3- $\beta$ -glucan), Glucan phosphate で、阻害がかかる。

参考文献：Brown GD, Gordon S. Immune recognition. A new receptor for beta-

glucans. *Nature*. 2001 Sep 6;413(6851):36-7.

参考文献 : Adachi Y, Ishii T, Ikeda Y, Hoshino A, Tamura H, Aketagawa J, Tanaka S, Ohno N. Characterization of beta-glucan recognition site on C-type lectin, dectin 1. *Infect Immun*. 2004 Jul;72(7):4159-71.

#### 4. CD72:キンドリング後海馬で 1/11 発現減少。

Non calcium binding type; Fucoidan と強く結合する。

参考文献 : Matsumoto N, Ribaudo RK, Abastado JP, Margulies DH, Yokoyama WM. The lectin-like NK cell receptor Ly-49A recognizes a carbohydrate-independent epitope on its MHC class I ligand. *Immunity*. 1998 Feb;8(2):245-54.

参考文献 : Bilan MI, Grachev AA, Ustuzhanina NE, Shashkov AS, Nifantiev NE, Usov AI. Structure of a fucoidan from the brown seaweed *Fucus evanescens* C.Ag. *Carbohydr Res*. 2002 Apr 17;337(8):719-30.

以上 4 種の C-type lectin が、発現変化を示した。C-type lectin の認識する糖鎖構造は、多様性に富んでいるため、特異性が高い。そこで、シュガーチップ上に Heparin, poly-glucose, fucoidan (polyfucose 等), polysialic acid 等の長鎖をつけることができれば、てんかん関連レクチンのスクリーニングに使えると推定できる。ただし、Clec1a は未だ論文報告がなく、糖鎖構造も推定できないため、Clec1a のレコンビナントを作成後、他種類の糖鎖構造を提示しているシュガーチップを用いたスクリーニングをおこなう必要がある。

### C. 考察及び結論

シュガーチップ作成後は、キンドリングマウス脳海馬、視床、大脳皮質より糖タンパク質を抽出する。その後シュガーチップ上で、てんかん誘導過程における糖鎖構造との結合性を検討し、診断として使える糖鎖構造を決定することができる。Siat4c は、てんかん誘導に連動した著しい発現変動を示すが、この場合特に、ネガティブコントロールとして Siat4c・ノックアウトマウスの脳抽出糖蛋白質を比較することにより、てんかん特異的糖鎖構造を決定することができる。以上、本年度はシュガーチップを利用する際の糖鎖構造の選定をおこなった。

### D. 研究発表

#### 1.論文発表 (総説)

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—

2. 学会等発表

1. 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」 題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
2. 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
3. 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
4. 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29-10月2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

### 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

分担研究者 山田雅雄 (株)モリテックス ナノ・バイオサイエンス研究所 所長

研究協力者 小川智央 (株)モリテックス ナノ・バイオサイエンス研究所 研究員

#### 研究要旨

光ファイバ技術を応用した局在プラズモン共鳴(LPR)測定装置の試作機を開発した。この装置は簡易アフィニティ測定を目的とする。作製した試作機を用いて装置構成の最適化を行った結果、当初の2倍以上のS/N向上を達成した。抗原抗体反応測定による性能検証を行い、抗原に対する抗体のアフィニティ測定ができることを確認した。またプロトコル確立のため、測定条件に関する検討を行った。

#### 目的

抗原抗体反応等のアフィニティ測定を行うバイオセンサとしては、表面プラズモン共鳴(SPR)測定装置が知られている。一般にSPRは大きい光学系とプリズムを必要とし、比較的大型な装置となる。そこで我々は、東京工業大学の梶川助教授の協力を得て、金ナノ粒子の局在プラズモン共鳴(LPR)効果と光ファイバ技術を応用したバイオセンサの開発を開始した。LPRでは従来のSPRよりも測定光学系を小さくすることができ、小型の簡易測定装置が実現可能となる。この装置はSPRと同様に金表面の屈折率変化を測定するため、無修飾のサンプルを用いて、抗原抗体のアフィニティ測定などの用途に用いることができる。また、ファイバの先端で測定を行うためセンシング部が小さく、数 $\mu$ Lといった微量サンプルの測定も可能である。

#### 方法

装置構成の検討、性能検証のため、ファイバ型LPR測定装置の試作機(図1)を作製し、光源、受光素子、データ処理方法等の検討を行った。性能検証のため、屈折率の測定、及びビオチンに対するストレプトアビジンの反応、ウシ血清アルブミン(BSA)に対する抗BSA抗体(anti-BSA)の反応の測定を行った。アミノシランカップリング剤修飾された光ファイバを、クエン酸により安定化した金コロイド(粒子サイズ約30 nm)溶液につけることによって金ナノ粒子がファイバ端面に固定され、その端面がセンシング部となる。屈折率測定の溶液としては、水(屈折率1.333)、エタノール(1.361)、メタノ

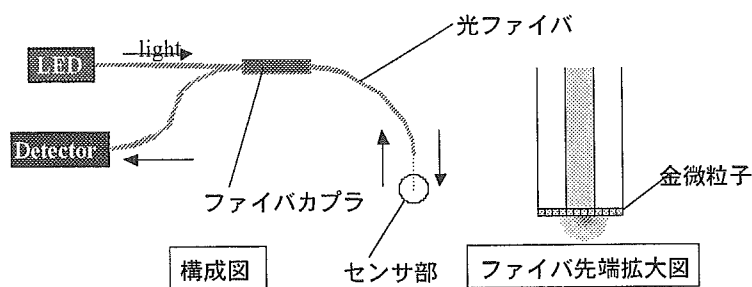


図1 LPR センサの概略図

ール(1.328)、イソプロピルアルコール(1.379)、シクロヘキサン(1.425)、トルエン(1.494)を用いた。ビオチン/ストレプトアビジンの測定は、金ナノ粒子に 11-aminoundecanethiol を吸着させ、末端のアミノ基にビオチン化した後にファイバをストレプトアビジンのりん酸バッファ(PBS)溶液に浸けることによって行った。BSA/anti-BSA の測定は、次の方法で行った。金ナノ粒子に 4,4-dibutylthiolic acid を吸着させ、DDA 末端のカルボキシル基を sulfo-NHS により活性化した。次にファイバを BSA の PBS 溶液に浸けることによって BSA の固定化を行い、引き続きエタノールアミン水溶液(EtA)でブロッキングを行った。そのファイバを anti-BSA の PBS 溶液に浸けることによってアフィニティ測定を行った。

### 結果・考察

当初は受光素子として光電子倍增管(PMT)、光源として発光ダイオード(LED)、検出器としてロックインアンプを用いていた。最適化を行った結果、受光素子としては PMT よりも低ノイズのアバランシェフォトダイオード(APD)を採用した。光源は LED から光ファイバへの入射効率を従来の7倍に向上させ、その結果 S/N は 2 倍向上した。以上の結果から、基本的には受光素子の低ノイズ化と光量を増加させることによって、S/N を向上できると考えられる。装置化のため APD からのデータ取得に 16bit AD コンバータを採用し、ローパスフィルタと組み合わせて使用した。専用の測定ソフトを開発し、ノイズ低減のために積算処理、データ処理を行った。その結果 0.1 mV までノイズ幅を低減することができたが、今後、より高い S/N が必要とされる場合は高分解能の AD コンバータを採用

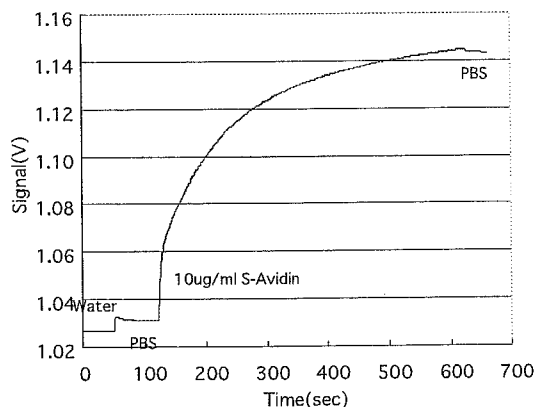


図2 ストレプトアビジンの測定



する必要がある。

最適化を行った試作機を用いて、溶液の屈折率測定を行った結果、屈折率 1.33 から 1.50 の領域でシグナルが線形に増加することが確認された。ビオチンに対するアビジンの吸着反応の測定結果を図 2 に示した。ストレプトアビジンの吸着反応は約 11% の変化率を示し、アビジンの吸着量が増える様子をモニタリングできていることが分かる。次に BSA と anti-BSA の反応を測定した結果を図 3 に示す。BSA の固定化時のシグナルは約 10% であり、それに対して 100, 50, 10  $\mu\text{g/ml}$  の anti-BSA を反応させた結果、それぞれ約 6%(反応時間 10 min)、3%(10 min)、1.5%(20 min) あった。1  $\mu\text{g/ml}$  では 40 min 測定を行ったが、ドリフトノイズが問題となりシグナルを読み取ることはできなかった。この結果は SPR で得られている感度と比較すると 1桁ほど低い値となったが、SPR と同様に吸着量の増加をリアルタイムでモニタリングできることが分かった。以上の結果より、この LPR 装置が検査・診断に応用できる可能性が確認された。従来の SPR と比較するとまだ性能が低いですが、今後安定性と S/N を上げることによって感度を向上できると考えられる。

従来、金ナノ粒子の光ファイバへの固定化はアミノ基と金コロイドのアフィニティにより行っていたが、このような固定化方法では糖鎖のような水溶性の高いリガンドを用いた際に金ナノ粒子の剥離等の現象が起き、うまく測定できないことが分かった。そこで、アミノシランカップリング処理をした表面をチオール基で修飾し、共有結合によって金ナノ粒子を固定化する手法を開発し、格段に安定した測定ができるようになった。

これまでの測定はサンプルチューブに試薬を入れ、そこにファイバを入れて静止状態で実験を行っていたが、サンプルチューブに小型のスターラーチップを入れ、攪拌しながら BSA に対する anti-BSA(50  $\mu\text{g/ml}$ ) の測定を行ったところ、約 1.4 倍のスピードで反応が進行した(図 4)。これは反応が静

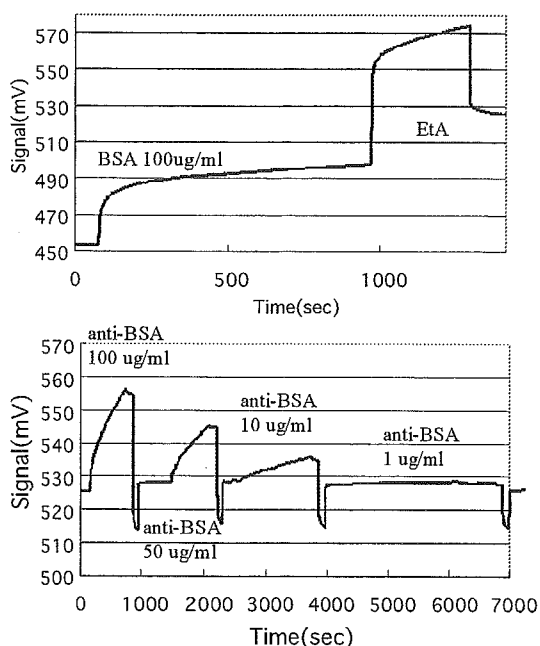


図 3 BSA の固定化と anti-BSA の測定

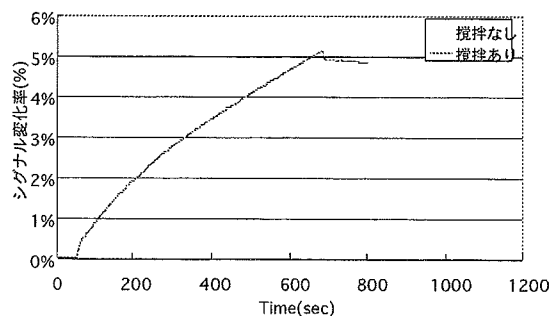


図 4 anti-BSA の反応速度の比較

止状態では拡散律速の状態であることを示しており、攪拌のような測定条件によって実験結果が異なることに留意しなければならない。また、SPR ではフロー系で測定が行われており、濃度分布の問題を近似的に回避しているが、通常、固体表面と溶液の反応系において速度解析を行う場合には、慎重に条件を吟味する必要があり、それは今回の測定系においても同様である。また、現状では測定時にファイバをそのまま用いているが、これはファイバ先端のセンシング部を接触させるなどの操作ミスによって実験に支障をきたす可能性が非常に高い。実用には先端部を保護した上で測定ができるような検出部の構成をとる必要があり、現在検討を進めている。

## 結論

金ナノ粒子の局在プラズモン共鳴を応用した相互作用解析測定装置の開発を行った。S/N の向上、装置化開発、装置の性能検証を行った。その結果、従来に比べ S/N が 2 倍向上した。屈折率測定、ビオチン/アビジン反応測定、BSA/anti-BSA 測定を行い、作製した装置の性能検証を行った。その結果、本センサは溶液の屈折率に対して線形に応答し、またタンパクの吸着反応をリアルタイムに測定できることが分かった。得られたシグナルは SPR の結果と比較すると低い感度であったが、今後装置の S/N と安定性を向上すれば感度は改善されると考えられる。反応のシグナルが測定時の攪拌などの操作により変化することや、測定時のファイバーの操作性の改善などを含め、再現性の確保のために今後測定方法を確立する必要がある。今後は、シュガーチップへの応用を含めたアプリケーションの開発、測定プロトコルの確立を行う予定である。

## 知的所有権の出願・登録状況等

1) 若尾雅広、隅田泰生（鹿児島大学）、小川智央((株)モリテックス)、“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、平成 18 年 3 月 10 日

研 究 成 果 の 刊 行 に 関 す る 一 覧 表

研究成果の刊行に関する一覧表  
書籍

著者氏名	論文タイトル名	書籍全体の編集者名	書籍名	出版社名	出版地	出版年	ページ
隅田泰生	糖鎖チップ	谷口直之、 伊藤幸也	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	エヌティージェス	東京	2005	474-481
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	永井克孝	未来を拓く糖鎖科学	金芳堂	京都	2005	74-75
Rainov NG, Whittle IR, Doh-ura K	Treatment options in patients with prion disease-the role of long term cerebroventricular infusion of pentosan polysulphate	Kitamoto T	Prions-Food and Drug Safety	Springer	Japan	2005	41-66
石田秀治 安藤弘宗 木曾 真	第2章 有機合成による糖鎖の構築 生理活性シアロ糖鎖	小林一清 正田晋一郎	糖鎖化学の最先端技術 The Recent Trends of Glycochemistry	シーエムシー出版	東京	2005	110-116
石田秀治 木曾 真	2章1 糖脂質の化学と応用	永井克孝	未来を拓く糖鎖科学	金芳堂	京都	2005	85-88
安藤弘宗 石田秀治 木曾 真	第3編第1章 第3節 グリコシル化反応のバージョンアップ	谷口直之 伊藤幸成	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	エヌティージェス	東京	2005	370-377
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の試み	日本糖尿病学会	糖尿病の進歩 2005	診断と治療社	日本	2005	138-141
荻原健英、 片桐秀樹、 岡芳知	治療方針(総論)	河盛隆造ほか	ファーマナビゲーター糖尿病編	メディカルレビュー社	日本	2005	50-56

雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
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
Yamada, T., Ishihara, H., Tamura, A., Takahashi., R, Yamaguchi, S., Takei., D, Tokita, A., Satake, C., Tashiro, F., Katagiri, H., Aburatani, H., Miyazaki, J-I., Oka, Y.	WFS1-deficiency enhances endoplasmic reticulum stress, triggers apoptotic pathway and impairs cell cycle progression specifically in pancreatic $\beta$ - cells.	Hum Mol Genet.		in press	2006
Yamada, T., Katagiri, H., Ishigaki, Y., Ogihara, T., Imai, J., Uno, K., Hasegawa, Y., Gao, J., Ishihara, H., Niiijima A., Mano, H., Aburatani, H., Asano, T., Oka Y.	Signals from intra-abdominal fat modulate insulin and leptin sensitivity through different mechanisms: Neuronal involvement in food intake regulation.	Cell Metab	3	223-229	2006
奥野寿臣	VZVの遺伝子とその産物	日本臨床 「ヘルペスウイル ス学 - 基礎・臨床 研究の進歩 -」	64(3)	133-139	2006
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)	Glycoconjugates J. (XVIII International Symposium on Glycoconjugates)	22	201	2005
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)			2005
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)			2005
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 の脳室内持続投与法の現状	Brain Medical	17(3)	259-264	2005

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
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
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
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	31(1)	80-87	2005
Yamaguchi, M., Ishida, H. Kanamori, A., Kannagi, R. Kiso, M.	6-O-Sulfo sialylparagloboside and sialyl Lewis X neoglycolipids containing lactamized neuraminic acid: synthesis and antigenic reactivity against G159 monoclonal antibody	Glycoconjugate Journal	22	95-108	2005
Imamura, A. Ando, H. Ishida, H. Kiso, M.	Di-tert-butylsilylene(DTBS)-directed $\alpha$ -selective synthesis of 4-methylumbelliferyl T-antigen	Organic Letters	7(20)	4415-4418	2005
Otsubo, N., Ishida, H. Kannagi, R., 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
Ando, H., Koike, Y. Koizumi, S., Ishida, H. 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
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, T.	Dissipating excess energy stored in the liver is a potential treatment strategy for diabetes associated with obesity.	Diabetes	54	322-332	2005

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
Imai, J., Katagiri, H., Yamada, T., Ishigaki, Y., Ogihara, T., Uno, K., Hasegawa, Y., Ishihara, H., Sasano, H., Mizuguchi, H., Asano, T., Oka, T.	Constitutively active PDX1 induced efficient insulin production in adult murine liver.	Biochem Biophys Res Commun.	326	402-409	2005
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.	A novel protein kinase B (PKB)/AKT-binding protein enhances PKB kinase activity and regulates DNA synthesis.	J Biol Chem.	280	18525-18535	2005
片桐秀樹 (監修)	特集 メタボリックシンドローム研究の最前線：肥満糖尿病の予防と治療を目指して	細胞工学	24(5)		2005
片桐秀樹	序：肥満研究から明らかとなりつつある個体としてのエネルギー恒常性機構	細胞工学	24(5)	442 - 444	2005
山田哲也、石垣泰、岡芳知、片桐秀樹	肥満・糖尿病治療法開発研究	細胞工学	24(5)	481 - 484	2005
岡芳知、石垣泰、山田哲也、片桐秀樹	肥満・糖尿病に対する先進的治療の開発	Therapeutic Research	26(8)	1537 - 1540	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)	23	144	2005

研 究 成 果 の 刊 行 物 ・ 別 刷



Program Number: 898

Day / Time: Monday, Dec. 19, 8:00 PM – 10:00 PM

## Carbohydrate – immobilized gold nano – particles: An on – site analytical tool for detecting the interactions between oligosaccharides and proteins

Y.Suda<sup>1,2</sup>; Y.Kishimoto<sup>2</sup>; T.Nishimura<sup>2</sup>; S.Yamashita<sup>2</sup>; H.Nakagawa<sup>2</sup>; M.Hamamatsu<sup>1</sup>;  
M.Uetani<sup>1</sup>; M.Wakao<sup>1</sup>

*1. Nanostructure and Advanced Materials, Kagoshima University, Kagoshima, Japan; 2. Japan Science and Technology Agency, Tokyo, Japan*

We have developed an analysis method using surface plasmon resonance (SPR) to study the interactions between carbohydrates and proteins. The key factors in the method are novel specific linker molecules immobilizing carbohydrate onto a gold-coated SPR chip. Although SPR has many advantages in assay, such as no need for labeling, real time and high throughput, a large and expensive instrument is necessary. Here, we applied our immobilization technique to gold nano-particles for the on-site analysis using plasmon

absorption. A ligand conjugate containing  $\alpha$ -D-glucopyranoside was prepared using our linker molecule and D-maltose. The conjugate was then reacted with gold nano-particle, which was prepared from sodium tetrachloroaurate (III) with sodium borohydride as a reducing reagent. To remove the excess conjugate and reagent, a dialysis (MWCO 3,500)

was done against water and PBS, preparing  $\alpha$ -D-glucopyranoside immobilized gold nano-particle (abbreviated as Glc $\alpha$ -GNP). The color of Glc $\alpha$ -GNP in PBS was purple,

showing plasmon absorption at 520 nm. When Glc $\alpha$ -GNP was incubated with Concanavalin A (Con A) with stirring, the colloid solution became colorless as nano-particles were aggregated in a few seconds. The change was detected visually and the rate of change was dependent on the concentration of Con A. By measuring the optical density at 520 nm, the dissociation constant ( $K_D$ ) was calculated to be 940 nM, which was similar to that obtained by conventional SPR experiments using the same ligand conjugate. In contrast, no change was found when a control protein, BSA, was incubated with Glc $\alpha$ -GNP. The aggregate was dissolved by the addition of excess D-glucose or 1 M HCl and the Con A in the original solution was quantitatively recovered. This method offers an easy and quick purification of lectin protein by our system.

**Citation:** Y.Suda, Y.Kishimoto, T.Nishimura, S.Yamashita, H.Nakagawa, M.Hamamatsu, M.Uetani, M.Wakao. Carbohydrate – immobilized gold nano – particles: An on – site analytical tool for detecting the interactions between oligosaccharides and proteins. Program No. 898. *2005 Abstract Viewer*. Honolulu, Hawaii: International Chemical Congress of Pacific Basin Societies

Application Design and Programming Copyright ScholarOne, Inc. All Rights Reserved. Patent Pending.

Program Number: 1005

Day / Time: Tuesday, Dec. 20, 8:30 AM – 8:45 AM

## Development of a sugar chip: Advanced analytical system for the binding interaction of structurally defined oligosaccharides using surface plasmon resonance ( SPR )

Y.Suda<sup>1,2</sup>; T.Nishimura<sup>2,1</sup>; Y.Kishimoto<sup>2</sup>; S.Yamashita<sup>2</sup>; H.Nakagawa<sup>2</sup>; A.Arano<sup>2</sup>; M.Sato<sup>1</sup>; A.Saito<sup>1</sup>; M.Wakao<sup>1</sup>; J.Murray-Wijelath<sup>3</sup>; E.Wijelath<sup>3</sup>; K.Strand<sup>3</sup>; M.Sobel<sup>3</sup>

*1. Department of Nanostructure and Advanced Materials, Kagoshima University, Kagoshima, Japan; 2. Japan Science and Technology Agency, Tokyo, Japan; 3. Department of Surgery, University of Washington, Seattle, WA*

Oligosaccharides are increasingly being recognized as important partners in receptor–ligand binding and cellular signaling. Surface plasmon resonance (SPR) is a very powerful tool for the real–time study of the specific interactions between biological molecules. We report here an advanced method for the immobilization of oligosaccharides in clustered formations onto a gold–coated chip, as a "sugar chip" for SPR, and also report its application to the analysis of heparin–protein interactions. Mono–, tri– or tetra–valent linker compounds were designed. A synthetic, structurally defined disaccharide unit of heparin was incorporated to the linker and, thus, immobilized as a mono– or multi–valent ligand for SPR and the binding interaction with an important hemostatic protein, von Willebrand factor (vWF), and its known heparin–binding domain were quantitatively analyzed. Using the multi–valent ligand–conjugates prepared in this report, the binding interaction was reproducibly measured without significant variability in the surface. This novel technique for oligosaccharide immobilization in SPR studies is accurate, specific and easily applicable to both synthetic and naturally derived oligosaccharides. Further application of sugar chips for integrins and other lectin proteins with a combination of MALDI–TOF/MS analysis will be discussed.

**Citation:** Y.Suda, T.Nishimura, Y.Kishimoto, S.Yamashita, H.Nakagawa, A.Arano, M.Sato, A.Saito, M.Wakao, J.Murray–Wijelath, E.Wijelath, K.Strand, M.Sobel. Development of a sugar chip: Advanced analytical system for the binding interaction of structurally defined oligosaccharides using surface plasmon resonance ( SPR ). Program No. 1005. *2005 Abstract Viewer*. Honolulu, Hawaii: International Chemical Congress of Pacific Basin Societies Application Design and Programming Copyright ScholarOne, Inc. All Rights Reserved. Patent Pending.

ADVANCED ANALYTICAL SYSTEMS FOR THE  
BINDING INTERACTION OF STRUCTURALLY  
DEFINED OLIGOSACCHARIDES WITH  
PROTEINS/CELLS: USE OF SURFACE PLASMON  
RESONANCE (SPR) OR GOLD NANO-PARTICLES  
(GNP)

Suda, Y. (1,2); Nishimura, T. (1,2); Kishimoto, Y. (2); Yamashita, S. (2); Sato, M. (1); Uetani, M. (1); Hamamatsu, M. (1); Saito, A. (1); Wakao, M. (1); Murray-Wijelath, J. (3); Wijelath, E. (3); Strand, K. (3); Sobel, M. (3)

(1) *Kagoshima Univ. Kagoshima, Japan*

(2) *Japan Science and Technology Agency, Tokyo, Japan*

(3) *Univ. of Washington Medical School, Seattle, WA, USA*

SPR is a very powerful tool for the real-time study of the specific interactions between biological molecules without labeling. We developed an advanced method for the immobilization of oligosaccharides onto a gold-coated chip for SPR. Linker compounds containing thioctic acid were designed. A synthetic, structurally defined disaccharide in heparin was incorporated to the linker and thus immobilized as a ligand for SPR, and the binding interaction with von Willebrand factor (vWF), its known heparin-binding domain, and integrins were quantitatively analyzed. Also various

oligosaccharides were similarly immobilized on chips and their interaction with lectin proteins were systematically evaluated. The bound proteins on the chip were further analyzed with MALDI-TOF/MS.

To establish an on-site analytical tool, the above immobilization technique was applied to GNP. For example, a ligand-conjugate containing  $\alpha$ -D-glucopyranoside was prepared using the linker, and was then reacted with GNP, followed by dialysis to prepare  $\alpha$ -D-glucopyranoside immobilized GNP (Glc $\alpha$ -GNP). The color of Glc $\alpha$ -GNP in PBS was purple, showing plasmon absorption at 520 nm. When Glc $\alpha$ -GNP was incubated with Con A, the colloid solution became colorless as nano-particles were quickly aggregated. The change was detected visually and the rate of change was dependent on the concentration of Con A. The dissociation constant was calculated to be 940 nM, which was similar to that obtained by SPR using the same ligand-conjugate. The aggregate was dissolved by adding excess D-glucose or 1 M HCl, and the Con A in the original solution was quantitatively recovered, offering a quick purification of protein.

### 5.4 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 Analysis of carbohydrate-protein interaction by sugar-chip and surface plasmon resonance

細胞表層や細胞外間隙に存在する糖鎖は、ウイルスや細胞の表層に存在するタンパク質、また成長因子などのタンパク質のレセプターとして生命現象に不可欠な役割を演じています。このような糖鎖とタンパク質との相互作用を、分子レベルで簡便に測定する方法として、表面プラズモン共鳴\* (SPR) 法と糖鎖チップ\*を用いた解析法を開発しました。分子レベルでの考察を可能とするためには、少なくとも結合に関与する糖鎖の一次構造が明確である必要があります。しかし、構造明確な糖鎖を、その結合挙動を従来の手法で十分に解析するだけの量を獲得

することは、現在の糖鎖合成技術によっても容易ではありません。最近、貴重な糖鎖を有効利用するために、糖鎖をガラスやプラスチックプレート・膜や金コートしたチップに固定化して再利用することで量的な問題を解決し、かつ網羅的なスクリーニングもできる糖鎖アレイ (array) と称する方法が報告されています<sup>19)</sup>。また、金属表面のプラズモン波と金属膜のエバネッセント波との共鳴挙動が金属表面の状態によって変化することを利用して、生体分子間のわずかな結合挙動を対象分子を標識することなく測定できる SPR 法を用いた機器が 1990 年頃

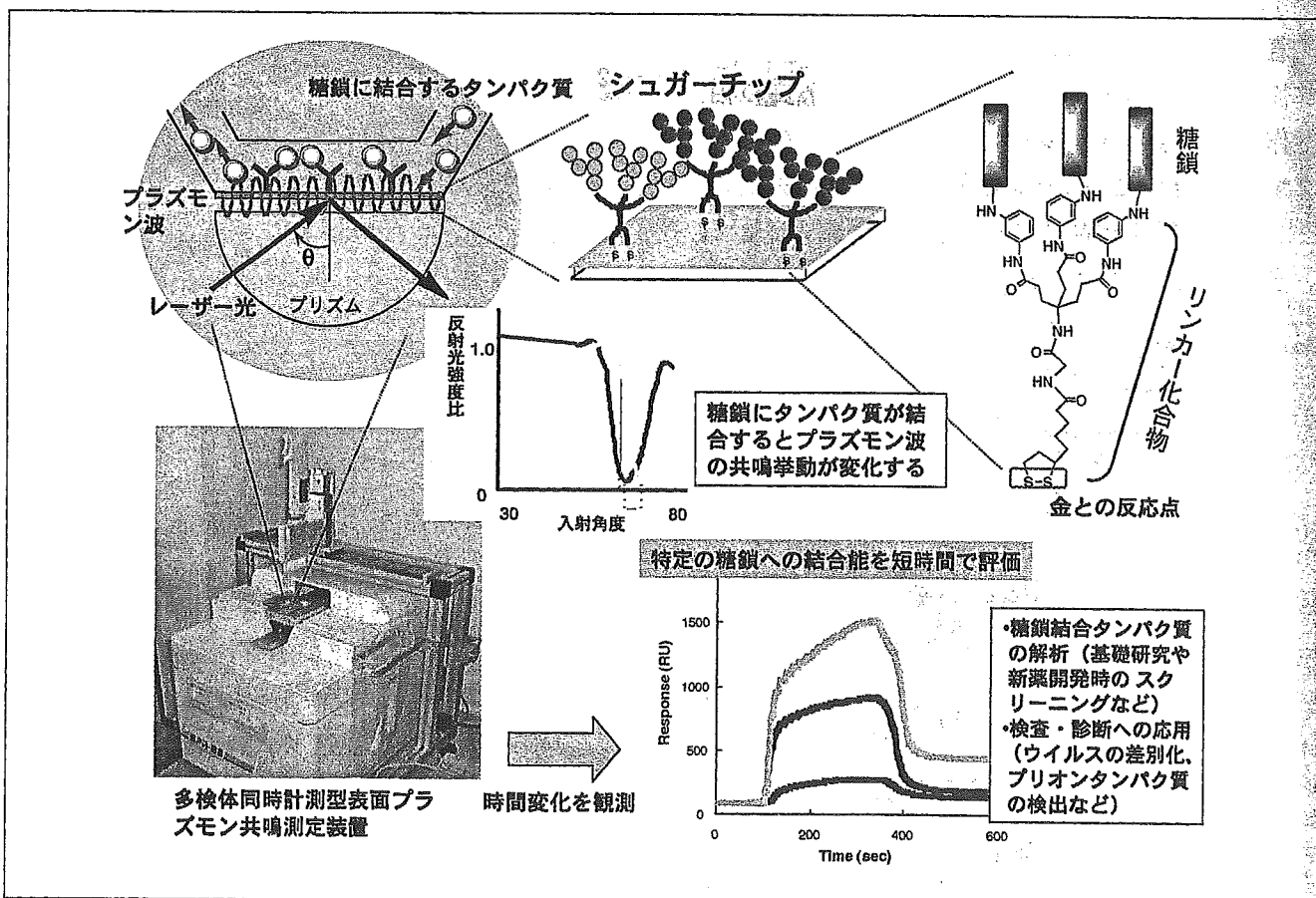


図 糖鎖チップ (シュガーチップ) とそれを用いた SPR 測定の概要