

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18年度 総括研究報告書

主任研究者 隅田 泰生

平成19年（2007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 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	
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成ならびに SPR および MLDI-TOF/MS 解析 隅田泰生（鹿児島大学大学院理工学研究科）	11
プリオン蛋白質とヘパリン部分構造との相互作用（その2） 堂浦克美（東北大学大学院医学系研究科）	20
糖尿病やその合併症診療への応用 片桐秀樹（東北大学大学院医学系研究科）	28
シアル酸含有オリゴ糖鎖の合成 石田秀治（岐阜大学応用生物科学部）	36
オリゴ糖を用いたウイルス感染症の診断技術の開発 奥野寿臣（兵庫医科大学病原微生物学）	41
てんかん等の脳疾患への応用 加藤啓子（大阪府立大学生命環境科学研究科）	44
がん疾患への応用（シュガーチップを用いた腫瘍マーカーの探索） 奥 直人（静岡県立大学薬学部）	48
ウイルス感染症(ATL)への応用：糖鎖を標的とした成人 T 細胞白血病の新規治療法開発 有馬直道（鹿児島大学大学院医歯学総合研究科）	50
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 山田雅雄（株式会社モリテックス）	52
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

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）

平成18年度 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

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

オリゴ糖鎖（以下、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。糖鎖の生理活性には、複雑な糖鎖構造が密接に関係しており、また糖鎖1分子の活性は弱いため、生体内ではそれらが集合して働いている。これら特徴を持つ糖鎖とその作用相手との結合相互作用をナノメータースケール（分子レベル）で迅速に解析することを目的として、我々は構造明確な糖鎖を固定化したバイオデバイス「シュガーチップ」および糖鎖固定化金ナノ粒子「SGNP」を開発した。そして、糖鎖が結合する蛋白質や細胞などとの相互作用を無標識で迅速・簡便に測定できる系を確立させ、既に基礎研究において大きな成果を上げている。本研究班では、以下の分担研究者の協力のもと、これらのデバイスを用いて迅速な検査・診断や病原因子の解明を行う先端医療技術の開発を行っている。具体的には、(i) ウイルス感染及び癌疾患と細胞表面オリゴ糖；(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、また(v) ナノテクノロジーを用いた新しい測定機器の開発を進めている。以下に、本年度の成果をまとめる。

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）

奥 直人 静岡県立大学薬学部・教授

（癌疾患への応用）

有馬直道 鹿児島大学大学院医歯学総合研究科・

## 教授

(ウイルス感染症 (ATL) への応用)

### 本年度までの成果

1. 前年度から引き続き、総数約 70 種のシュガーチップを作製し、アレイタイプのシュガーチップの実用化の検討を終了した。また、本年度糖鎖固定化金ナノ粒子 (SGNP) を 13 種類作製した。
2. 平成 17 年度に行った予備的検討から 8 種類の糖鎖を選択してアレイタイプのシュガーチップを作製し、A 型インフルエンザウイルス 15 株に対して結合特性を検討し、血清型にはない結合特異性を見出し、糖鎖結合パターンによって、ウイルス株のグループ化が可能であることを明らかとした。
3. VEGF (血管内皮増殖因子) とフィブロネクチンの結合特性を評価し、ヘパリンの結合促進および阻害活性を評価した。
4. 東北大学病院糖尿病代謝科通院中の糖尿病患者を糖尿病性合併症の有無で分類し、血清を採取した。これらの患者血清を用いてアレイタイプのシュガーチップにて糖鎖結合蛋白のパターン検討を行った。合併症を持たない糖尿病患者に比べ、重症の網膜症・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が存在する傾向を認めたので、現在症例数を増やしてこの傾向を検討している。
5. ヘパリンはプリオン病の治療的効果を示すことが知られており、前年度までにヘパリン中のある部分構造が精製プリオン蛋白と結合することを、シュガーチップを利用して明らかとした。18年度は、プリオン蛋白側の結合部位を同定するべく、一連の改変プリオン蛋白を調製し結合実験に供し、ヘパリン結合ドメインを推定した。
6. てんかん誘導に関連する神経領域、海馬や大脳皮質帯状回において病理所見を示す  $\alpha$ 2,3-シアル酸転移酵素 (ST3Gal IV) のコンディショナルノックアウトマウスの脳組織の糖鎖構造をレクチンを用いた組織化学法により検討した。また、キンドリングマウスの作成方法の改良に取り組み、80-90%の成功率を得るに至り、それによって変動する蛋白質の糖鎖結合性をアレイタイプのシュガーチップで調べることが可能となった。そして、てんかん症状に依存した差異があることを見いだした。
7. フコシル $\alpha$ 1-4/8 シアル酸構造の構築、GM2 類縁体の合成、NKT 細胞のリガンドである  $\alpha$ -GalCer 及び iGb3 の全合成に成功した。一方で、複合糖質をリガンドとする受容体タンパク質の構造生物学的研究に取り組み、ヒトシアリダーゼやインフルエンザ表面タンパク質ヘムグルチニンの計算化学による立体構造解析を行った。
8. 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、17年度は 1 チャンネル装置を作製し、18年度に完成させた。また、多チャンネル化へ向け内部構成の改良を行い、8 チャンネル同時測定装置を平成 19 年度中に完成させる見込みがついた。
9. 難治性造血器腫瘍である成人 T 細胞白血病 (ATL) 細胞株を抗原として作製したマウスハイブリドーマ上精の糖鎖結合活性をアレイ型のシュガーチップで検討し、ルイス x 構造などいくつかの糖鎖に結合するハイブリドーマ上精を選択した。
10. 糖鎖チップを用いて、糖脂質特異的な新規バ

イオマーカの探索を行った。すなわち、担がんおよび正常マウスより、血清を採取し、シュガーチップに対する接着性の異なるスポットを検索した。その結果、いくつかの糖鎖に対する結合物質質量が担がんでむしろ下がることを確認した。現在その詳細を解析している。

## 研究発表

### 1. 論文・総説・著書等

- M. Akamatsu, Y. Fujimoto, M. Kataoka, Y. Suda, S. Kusumoto, and K. Fukase, "Synthesis of lipid A monosaccharide analogues containing acidic amino acid: Exploring the structural basis for the endotoxic and antagonistic activities", *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, **14**, 6759-6777(2006)
- Y. Suda, Y. Kishimoto, T. Nishimura, S. Yamashita, M. Hamamatsu, A. Saito, M. Sato, M. Wakao, "Sugar-immobilized gold nano-particles (SGNP): Novel bioprobe for the on-site analysis of the oligosaccharide protein interactions", *Polymer Preprints*, **47**(2), 156-157(2006)
- Errol S. Wijelath, S. Rahman, M. Namekata, J. Murray, T. Nishimura, Z. Mostafavi-Pour, Y. Patel, Y. Suda, M. J. Humphries, M. Sobel, "Heparin-II Domain of Fibronectin Is a Vascular Endothelial Growth Factor-Binding Domain. Enhancement of VEGF Biological Activity by a Singular Growth Factor/Matrix Protein Synergism", *Circ Res.*, **99**(8), 853-860(2006)
- Y. Suda, A. Arano, Y. Fukui, S. Koshida, M. Wakao, T. Nishimura, S. Kusumoto, M. Sobel, "Immobilization and Clustering of Structurally Defined Oligosaccharides for Sugar Chips: An Improved Method for Surface Plasmon Resonance Analysis of Protein-Carbohydrate Interactions", *Bioconjug Chem.*, **17**(5), 1125-1135(2006)
- M. Hashimoto, K. Tawaratsumida, H. Kariya, A. Kiyohara, Y. Suda, F. Kirikae, T. Kirikae, and F. Gotz, "Not Lipoteichoic Acid but Lipoproteins Appear to Be the Dominant Immunobiologically Active Compounds in *Staphylococcus Aureus*", *The Journal of Immunology*, **177**, 3162-3169(2006).
- M. Kataoka, M. Hashimoto, Y. Suda, S. Kusumoto, and K. Fukase, "Synthesis and Biological Activities of Biscarboxymethyl Lipid A Analogues", *Heterocycles*, **69**, 395-415(2006)
- 隅田泰生、「ヘパリンと血小板ならびにフォンビルブランド因子との相互作用解析からシュガーチップの開発へ」、ドージンニュース No.121、2006年12月25日
- Doh-ura K., Tamura K, Karube Y, Naito M, Tsuruo T, Kataoka Y: Chelating compound, chrysoidine, is more effective in both anti-prion activity and brain endothelial permeability than quinacrine. *Cell. Mol. Neurobiol.*, (in press)
- Fukuuchi T, Doh-ura K., Yoshihara S, Ohta S: Metal complexes with superoxide dismutase-like activity as candidates for anti-prion drug. *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **16**:5982-5987 2006
- Ishikawa K, Kudo Y, Nishida N, Suemoto T, Sawada T, Iwaki T, Doh-ura K.: Styrylbenzazole derivatives for imaging of prion plaques and treatment of transmissible spongiform encephalopathies. *J. Neurochem.*, **99**:198-205 2006
- Sasaki K, Doh-ura k., Ironside J, Mabbott N, Iwaki T: Clusterin expression in follicular dendritic cells associated with prion protein accumulation. *J. Pathol.*, **209**(4):484-91 2006.
- Wakisaka Y, Santa N, Doh-ura K., Kitamoto T, Ibayashi S, Iida M, Iwaki T: Increased asymmetric

- pulvinar magnetic resonance imaging signals in Creutzfeldt-Jakob disease with florid plaques following a cadaveric dura mater graft. *Neuropathol.*, 26:82-88 2006.
- Shintaku M, Yutani C, Doh-ura K: Brain stem lesions in sporadic Creutzfeldt-Jakob disease: A histopathological and immunohistochemical study. *Neuropathol.*, 26:43-49 2006.
- 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.*, 29(5):927-932 2006
- 逆瀬川裕二、堂浦克美. プリオン病の治療 —その現状と展望—. *Brain Medical*, 18(4):356-370, 2006
- 逆瀬川裕二、堂浦克美. 孤発性クロイツフェルトーヤコブ病と6種類のサブタイプ. *Medical Briefs in Brain & Nerve*, 15(4):5-6, 2006
- 石川謙介、堂浦克美. プリオンイメージングの試み. *Clinical Neuroscience*, 24(3):313-316, 2006
- Hasegawa Y, Ogihara T, Yamada T, Ishigaki Y, Imai J, Uno K, Gao J, Kaneko K, Ishihara H, Sasano H, Nakauchi H, Oka Y, Katagiri H. Bone Marrow (BM) Transplantation Promotes Beta Cell Regeneration after Acute Injury through BM Cell Mobilization. *Endocrinology* in press
- Okimoto H, Ishigaki Y, Koiwa Y, Hinikio Y, Ogihara T, Suzuki S, Katagiri H, Ohkubo T, Hasegawa H, Kanai H, Oka Y. A novel method for evaluating human carotid artery elasticity: possible detection of early stage atherosclerosis in subjects with type 2 diabetes. *Atherosclerosis* in press.
- Takahashi, R., Ishihara, H., Takahashi, K., Tamura, A., Yamaguchi, S., Yamada, T., Katagiri, H., Oka, Y. Efficient and controlled gene expression in mouse pancreatic islets by arterial delivery of tetracycline-inducible adenoviral vectors. *J. Mol. Endocrinol.* in press.
- Gao J., Katagiri H., Ishigaki Y., Yamada T., Ogihara T., Imai J., Uno K., Hasegawa Y., Kanzaki M., Yamamoto TT., Ishibashi S., Oka Y. (2007) Involvement of apolipoprotein E in excess fat accumulation and insulin resistance. *Diabetes*, 56: 24-33.
- Takei, D., Ishihara, H., Yamaguchi, S., Yamada, T., Katagiri, H., Maruyama, Y., Oka, Y. (2006). WFS1 protein modulates the free Ca<sup>2+</sup> concentration in the endoplasmic reticulum. *FEBS Lett.* 580: 5635-40.
- Imai, J., Katagiri, H., Yamada, T., Ishigaki, Y., Ogihara, T., Uno, K., Hasegawa, Y., Gao, J., Ishihara, H., Oka, Y. (2006) Activation of sympathetic nervous system suppresses serum adiponectin levels in mice. *Obesity*. 14, 1132-41.
- Uno K, Katagiri H, Yamada T, Ishigaki Y, Ogihara T, Imai J, Hasegawa Y, Gao J, Kaneko K, Iwasaki H, Ishihara H, Sasano H, Inukai K, Mizuguchi H, Asano T, Shiota M, Nakazato M, Oka Y. (2006) Neuronal pathway from the liver modulates energy expenditure and systemic insulin sensitivity. *Science* 312, 1656-9.
- 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. (2006) WFS1-deficiency enhances endoplasmic reticulum stress, triggers apoptotic pathway and impairs cell cycle progression specifically in pancreatic  $\beta$ -cells. *Hum Mol Genet.* 15, 1600-9.
- 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.

Hashimoto, M., Furuyashiki, M., Kaseya, R., Fukuda, Y., Akimaru, M., Aoyama, K., Okuno, T., Tamura, T., Kirikae, T., Kirikae, F., Eiraku, N., Morioka, H., Fujimoto, Y., Fukase, K., Takashige, K., Moriya, Y., Kusumoto, S., Suda Y. Evidence of immunostimulating lipoprotein existing in the natural lipoteichoic acid fraction. *Infect Immun.* (in press), 2007.

岡本紀夫、濱田文、西村雅史、栗本拓治、田上雄一、周允元、奥野寿臣、三村治：Birdshot choroideropathy の 1 例. *眼科*, 48: 1853-1858, 2006.

上田美子、岡本紀夫、奥野寿臣、三村治：Multiple evanescent white dot syndrome の 1 例. *眼科臨床医報*. 101: 7-8, 2007.

Kato K. (2007) Glycobiological approach to understanding neural plasticity *Trends in Glycoscience and Glycotechnology* in press.

## 2. 学会発表

T. Nishimura, Y. Kishimoto, S. Yamashita, M. Wakao, K. Strand, M. Sobel, Y. Suda, “Advanced Analytical Systems for the Binding Interactions between Oligosaccharides and Proteins/Cells, using Surface Plasmon Resonance or Gold Nano-Particles”, 20th IUBMB International Congress of Biochemistry and Molecular Biology and 11th FAOBMB Congress 20th IUBMB International Congress of Biochemistry and Molecular Biology and 11th FAOBMB Congress, (Abstracts p. 335, 2006), 京都市, June 20, 2006.

M. Hashimoto, K. Tawaratsumida, H. Kariya, Y. Suda, F.

Krikae, T. Krikae, F. Goetz, “Immunobiological activity of lipoteichoic acid fraction from *Staphylococcus aureus* Igt deficient mutant”, 20th IUBMB International Congress of Biochemistry and Molecular Biology and 11th FAOBMB Congress 20th IUBMB International Congress of Biochemistry and Molecular Biology and 11th FAOBMB Congress, (Abstracts p.532, 2006), 京都市, June 21, 2006.

Y. Suda, M. Hashimoto, M. Furuyashiki, K. Aoyama, T. Okuno, T. Kirikae, F. Kirikae, Y. Fujimoto, K. Fukase, S. Kusumoto, “Immunostimulating activity of natural lipoteichoic acid fraction is caused by the lipoprotein-like compounds co-existing in the fraction”, 20th IUBMB International Congress of Biochemistry and Molecular Biology and 11th FAOBMB Congress 20th IUBMB International Congress of Biochemistry and Molecular Biology and 11th FAOBMB Congress (Abstracts p.532, 2006), 京都市, June 21, 2006.

K. Tawaratsumida, Y. Suda, M. Hashimoto, “Characterization of Toll-like receptor 2-activating lipoproteins in *Staphylococcus aureus*” 20th IUBMB International Congress of Biochemistry and Molecular Biology and 11th FAOBMB Congress 20th IUBMB International Congress of Biochemistry and Molecular Biology and 11th FAOBMB Congress (Abstracts p.532, 2006), 京都市, June 21, 2006.

H. Kariya, A. Kiyohara, S. Masuda, M. Ueno, M. Hashimoto, Y. Suda, “Effect of CM-chitin in cartilage regeneration” 20th IUBMB International Congress of Biochemistry and Molecular Biology and 11th FAOBMB Congress 20th IUBMB International Congress of Biochemistry and



Molecular Biology and 11th FAOBMB Congress, (Abstracts p.564, 2006), 京都市, June 22, 2006.

岸本裕子、西村知晃、山下早希子、若尾雅広、隅田泰生、「糖鎖固定化金ナノ粒子(II)：オリゴ糖鎖と蛋白質との相互作用を On-Site で解析するためのツール」、第 26 回日本糖質学会年会 (要旨集、p.139、2006)、仙台市、2006 年 8 月 25 日

山下早希子、高橋優子、西村知晃、岸本裕子、若尾雅広、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」、第 26 回日本糖質学会年会 (要旨集、p.148、2006)、仙台市、2006 年 8 月 25 日

西村知晃、岸本裕子、山下早希子、若尾雅広、隅田泰生、「シュガーチップと表面プラズモン共鳴法を用いた分析システムの応用(I)」第 26 回日本糖質学会年会 (要旨集、p.148、2006)、仙台市、2006 年 8 月 25 日

齊藤彰寛、大石 紘、西村知晃、岸本裕子、若尾雅広、隅田泰生、「構造明確なヘパラン硫酸部分構造を固定化したシュガーチップ」、第 26 回日本糖質学会年会 (要旨集 p.164、2006)、仙台市、2006 年 8 月 25 日

Y. Suda, Y. Kishimoto, T. Nishimura, S. Yamashita, M. Hamamatsu, A. Saito, M. Sato, M. Wakao, "Sugar-immobilized gold nano-particles (SGNP): Novel bioprobe for the on-site analysis of the oligosaccharide-protein interactions", 232nd American Chemical Society National Meeting & Exposition (on-site program, Division of Polymer Chemistry, #228), San Francisco, CA, U.S.A., September 11, 2006.

隅田泰生、西村知晃、「シュガーチップの実用化」プレベンチャー事業 平成 15 年度採択課題研究開発成果報告会 (予稿集、pp.13-14、2006)、

東京都、2006 年 11 月 10 日

隅田泰生、「シュガーチップと糖鎖固定化金ナノ粒子(SGNP)：糖鎖と蛋白質、細胞、ウイルスとの結合相互作用を解析するための先端分析システム」、KAGAWA 機能糖鎖フォーラム第 4 回シンポジウム (講演要旨集、pp.13-15、2007)、香川県、2007 年 1 月 23 日

Y. Suda, "Sugar Chips: Advanced Analytical Systems for the Binding Interaction of Sugar Chains with Proteins, Cells or Viruses", 2006 International Conference on Chemical and Molecular Technologies (ICCMT 2006), (Abstracts, pp.30-31, 2007), Tainan, Taiwan, December 9, 2006.

隅田泰生、「シュガーチップを用いた検査診断技術の開発」総合科学技術会議 科学技術連携施策群「超早期診断と低侵襲医療の実現と一体化、生活の安全・安心を目指して」第一回ナノバイオテクノロジー連携群成果報告会、(要旨集、p.102、2006)、東京、2006 年 12 月 21 日

隅田泰生、「シュガーチップを用いた検査・診断技術の開発」、平成 18 年度厚生労働科学研究費研究成果等普及啓発事業萌芽的の先端医療技術推進事業ナノメディシン研究成果発表会、東京 2007 年 2 月 13 日

Doh-ura K: Therapeutic strategies for prion diseases. SFB-596 Meeting for Molecular Mechanisms of Neurodegeneration, Munich, October 16, 2006

Tsuboi Y, Doh-ura K, Yamada T: Experimental treatment with intraventricular pentosan polysulphate injection in prion disease. TheraPrion 2006, Paris, November 21, 2006

Doh-ura K, Rainov N, Ishikawa K, Kawasaki Y, Tsuboi Y: Pentosan polysulfate and amyloidophilic chemicals for prion diseases. NeuroPrion 2006, Torino, October 3-6, 2006

- Sakasegawa Y, Doh-ura K: Aggregation and degradation of cellular prion protein by Novobiocin. NeuroPrion 2006, Torino, October 3-6, 2006
- Ishikawa K, Kudo Y, Nishida N, Iwaki T, Doh-ura K: Styrylbenzazole derivatives for imaging of prion plaques and treatment of prion diseases. NeuroPrion 2006, Torino, October 3-6, 2006
- Kawasaki Y, Kawagoe K, Chen C.J, Doh-ura K: Effectiveness of an orally administered anti-prion chemical. NeuroPrion 2006, Torino, October 3-6, 2006
- Rainov N.G, Doh-ura K, Tsuboi Y, Krolak-Salmon P, Heidecke V: Experimental treatments for human prion diseases. NeuroPrion 2006, Torino, October 3-6, 2006
- Sakasegawa Y, Doh-ura K : A coumarin antibiotic Novobiocin directly induces aggregation of the cellular prion protein. The 20th IUBMB Congress and 11th FAOBMB Congress, Kyoto, June 18-23, 2006
- 堂浦克美 : プリオン病の治療戦略を展望する ― 即戦力的な方略 ―。第 28 回日本薬学会九州支部コロキウム、福岡、2006 年 10 月 21 日
- 堂浦克美 : プリオン病の治療開発。第 64 回慶應神経病理カンファレンス、東京、2006 年 9 月 9 日
- 照屋健太、魚本幸、堂浦克美 : プリオン感染細胞からの迅速かつ効率的な PrPres 回収法。2006 年プリオン研究会、安比高原、2006 年 9 月 2、3 日
- 川崎ゆり、川越敬一、陳忠正、堂浦克美 : 経口投与型プリオン病治療予防薬の開発に関する研究。2006 年プリオン研究会、安比高原、2006 年 9 月 2、3 日
- 堂浦克美、魚本幸、西澤桂子、川崎ゆり、伊波真彦 : Prophylactic effect of dietary seaweed fucoidan against enteral prion infection. 2006 年プリオン研究会、安比高原、2006 年 9 月 2、3 日
- 坪井義夫、堂浦克美、山田達夫 : プリオン病に対するペントサンポリサルフェート脳室内持続投与の試み(続報)。2006 年プリオン研究会、安比高原、2006 年 9 月 2、3 日
- 石川謙介、木村朋寛、工藤幸司、西田教行、岩城徹、堂浦克美 : Styrylbenzazole 誘導体を用いたプリオンアミロイド斑のイメージングおよび伝達性海綿状脳症の治療。2006 年プリオン研究会、安比高原、2006 年 9 月 2、3 日
- Sakasegawa Y, Hachiya NS, Doh-ura K, Kaneko K. Heat shock protein 90 kDa unfolds the copper loaded full length recombinant prion protein in a nucleotide dependent manner. 2006 年プリオン研究会、安比高原、2006 年 9 月 2、3 日
- 照屋健太、堂浦克美 : 蛋白質ライゲーションを利用したカルボキシ末端選択的に修飾を施したプリオン蛋白質の調製。東北大学バイオサイエンスシンポジウム、仙台、2006 年 5 月 29 日
- 山口恭史、三浦隆史、照屋健太、堂浦克美、竹内英夫 : 銅イオンによるプリオンタンパク質のコンホメーション変化。東北大学バイオサイエンスシンポジウム、仙台、2006 年 5 月 29 日
- 荻原健英、片桐秀樹、長谷川豊、岡芳知 メインシンポジウム 3 骨髄移植を利用した再生医療 骨髄移植を利用した膵β細胞の再生治療 第 79 回日本内分泌学会学術総会 2006 年 5 月 21 日 神戸
- 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 1 3 肝におけるインスリン産生細胞の創生と骨髄細胞動員による膵β細胞の再生 第 49 回日本糖尿病学会年次学術総会 2006 年 5 月 26 日 東京

片桐秀樹 特別講演 神経系を介した臓器間の協調的代謝調節機構～メタボリックシンドロームの新規治療法の開発をめざして～ 第19回肥満と糖尿病談話会 2006年8月28日 福岡

片桐秀樹 特別講演 個体におけるエネルギー代謝調節～臓器間代謝情報ネットワークとその治療応用の可能性～ 第9回 Osaka Bay Diabetes Forum 2006年9月16日 大阪

片桐秀樹 特別講演 個体におけるエネルギー代謝調節～臓器間代謝情報ネットワークとその治療応用の可能性～第19回東京肥満研究会 2006年9月20日 東京

片桐秀樹 シンポジウム5 自律神経系を介した協調的エネルギー代謝調節機構 第27回日本肥満学会 2006年10月27-28日 神戸

片桐秀樹 シンポジウム 神経系を介した臓器間の協調的代謝調節機構～メタボリックシンドロームの新規治療法の開発をめざして～ 第362回東北医学会例会シンポジウム 2006年12月8日 仙台

山田哲也、片桐秀樹、宇野健司、石垣泰、鈴木進、岡芳知 肝臓からの神経シグナルがエネルギー消費と個体のインスリン感受性を調節する 第18回分子糖尿病学シンポジウム 12月9日 松山

片桐秀樹 臓器間代謝情報ネットワークによる糖・エネルギー代謝の協調的調節 第2回体温調節、温度受容研究会 2007年1月11-12日 岡崎

片桐秀樹 特別講演 臓器間情報ネットワークによる糖・エネルギー代謝の協調的調節 第3回 Diabetes Research Conference 学術講演会 2007年1月26日 金沢

片桐秀樹 特別講演2 臓器間情報ネットワークによる糖・エネルギー代謝の協調的調節 第21

回日本糖尿病動物研究会年次学術集会 2007年2月9-10日 盛岡

片桐秀樹 招聘講演 臓器間情報ネットワークによる糖・エネルギー代謝の協調的調節 第3回 宮崎サイエンスキャンプ 2007年2月16-18日 宮崎

片桐秀樹 特別講演 Metabolic Information Highway 第3回 META CARE カンファレンス 2007年2月21日 東京

Katagiri H., Uno K., Yamada T., Oka Y. Neuronal Pathway from the Liver Modulates Energy Expenditure and Systemic Insulin Sensitivity. American Diabetes Association, 66th Scientific Sessions, June 9-13 2006 Washington, DC, USA

Yamada T., Katagiri H., Ishigaki Y., Oka Y. Signals from Intra-Abdominal Fat Modulate Insulin and Leptin Sensitivity through Different Mechanisms: Neuronal Involvement in Food Intake Regulation. American Diabetes Association, 66th Scientific Sessions, June 9-13 2006 Washington, DC, USA

Gao J., Katagiri H., Ishigaki Y., Oka Y. Apolipoprotein E Involvement in Excess Fat Accumulation and Insulin Resistance. American Diabetes Association, 66th Scientific Sessions, June 9-13 2006 Washington, DC, USA

Ogihara T., Katagiri H., Hasegawa Y. Oka Y. Bone Marrow-derived Cell Recruitment Is Involved in Regeneration after Pancreatic Beta Cell Injury. 20th IUBMB International Congress of Biochemistry and Molecular Biology June 18-23, 2006 Kyoto, Japan

Katagiri H. Novel Inter-Organ Communication Involved in Glucose and Energy Homeostasis. The 11<sup>th</sup> Adiposcience Symposium, Aug 19, 2006, Osaka, Japan

Uno K., Katagiri H., Yamada T., Oka Y. Neuronal

- Pathway from the Liver Modulates Energy Expenditure and Systemic Insulin Sensitivity. Tohoku University 21st century COE program The 3rd International Symposium Nov. 9-11, 2006 Sendai
- Hasegawa Y., Katagiri H., Ogihara T., Saito T., Oka Y. Bone Marrow Transplantation Promotes Cell Regeneration after Acute Injury through Bone Marrow Cell Mobilization. Tohoku University 21st century COE program The 3rd International Symposium Nov. 9-11, 2006 Sendai
- 池田翔子、宮森将光、石田秀治、木曾真：ウシ脳由来新規塩基性糖脂質の合成研究、日本農芸化学会2006年度大会、京都、2006年3月26～28日。
- 佐藤哲郎、小澤恭子、石田秀治、木曾真：ビフィズス菌由来酵素特異的基質の設計と合成、日本農芸化学会2006年度大会、京都、2006年3月26～28日。
- 藤川紘樹、石田秀治、木曾真：還元末端グルコースを鍵とする効率的糖脂質合成法の開発、日本農芸化学会2006年度大会、京都、2006年3月26～28日。
- 吉川武、加藤裕貴、石田秀治、木曾真：GM1 epitope糖供与体の効率的合成と応用、日本農芸化学会2006年度大会、京都、2006年3月26～28日。
- 小森達也、藤川紘樹、今村彰宏、石田秀治、木曾真：GM2類縁体母核三糖構造の効率的合成と応用、日本農芸化学会2006年度大会、京都、2006年3月26～28日。
- 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、日本農芸化学会2006年度大会、京都、2006年3月26～28日。
- 加藤裕貴、石原幹生、三郎丸みゆき、石田秀治、木曾真：ギラン・バレー症候群発症に関与するC. jejuniリポオリゴ糖の合成、日本農芸化学会2006年度大会、京都、2006年3月26～28日。
- 澤田敏彦、安藤弘宗、石田秀治、木曾真：インフルエンザウィルスと反応するジシアロ糖鎖リガンドの合成研究、日本農芸化学会2006年度大会、京都、2006年3月26～28日。
- 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コアならびに $\alpha$ -Gal-cerの効率的合成研究、日本農芸化学会2006年度大会、京都、2006年3月26～28日。
- 今村彰宏、安藤弘宗、石田秀治、木曾真：DTBS効果を利用した4-methylumbelliferyl T抗原の効率的合成、日本農芸化学会2006年度大会、京都、2006年3月26～28日。
- 高久博直、石田秀樹、藤田雅也、稲津敏行、石田秀治、木曾真：ヒアルロン酸合成酵素の詳細な反応機構解明を目的とした、UDP-2糖の合成研究、日本農芸化学会2006年度大会、京都、2006年3月26～28日。
- 片野由加里、安藤聖敏、安藤弘宗、石田秀治、木曾真：環状ペプチド架台を用いたMBP高親和性糖鎖プローブの設計と構築、日本農芸化学会2006年度大会、京都、2006年3月26～28日。
- Magesh, S., Suzuki, T., Miyagi, T., Ishida, H., Kiso, M. : Comparative Protein Modeling of Human Sialidases : Implications for the Design of Selective NEU3 Inhibitors. XXIII International Carbohydrate Symposium, Whistler, Canada, July 23-28 2006.
- Sato, T., Ozawa, K., Imamura, A., Ando, H., Ishida, H., Kiso, M. : Di-*tert*-butylsilylene-Directed  $\alpha$ -S selective Synthesis of 4-Methylumbelliferyl T-antigen and p-Nitrophenyl T-antigen analogs. XXIII International Carbohydrate Symposium, Whistler, Canada, July 23-28 2006.

Takaku, H., Sato, J., Ishida, H.-K., Inazu, H., Ishida, H., Kiso, M. : A Chemical Synthesis of UDP-LacNAc and its Regioisomer for Finding 'Oligosaccharide transferases'. XXIII International Carbohydrate Symposium, Whistler, Canada, July 23-28 2006.

高久博直、石田秀樹、藤田雅也、佐藤淳平、稲津敏行、石田秀治、木曾真：糖関連酵素の機能解明を目的としたUDP-2糖の合成研究、第26回日本糖質学会年会、仙台、2006年8月23～25日。

Magesh, S., Suzuki, T., Miyagi, T., Ishida, H., Kiso, M. : Towards the Design of Human Sialidase 3 (NEU3) Selective Inhibitors: Homology Modeling and Preliminary Docking Studies. Sialoglycoscience 2006, Mishima, Japan, August 27-31 2006.

大谷成人、邵輝、奥野寿臣：タンポポ(Taraxacum officinale)の $\alpha$ ヘルペスウイルスに対する抗ウイルス効果。第54回日本ウイルス学会学術集会、名古屋、2006。

Miyamoto K, Hirabayashi Y, Osuka SF, Kuwamura M, Okada T, Endo S, Itohara S, Ikeda T, and Kato K. The effect of Siat 4c deficiency on brain function of the adult mouse. 20<sup>th</sup> IUBMB International Congress of Biochemistry and Biology and 11<sup>th</sup>, 6/18-23 2006

S. Sekino, Y. Hirabayashi, K. Yoshida, To. Okada, and K. Kato, Differential expression of mRNAs for molecules related with glycosylation in a Mouse Model of Temporal Lobe Epilepsy. 20<sup>th</sup> IUBMB International Congress of Biochemistry and Biology and 11<sup>th</sup> 6/18-23 2006

Kato K Molecular dynamics in kindling-epileptogenesis: effects of glycosylation Neuroscience course

in NC State university 7/27,2006

### 3. 知的所有権の出願・登録状況

堂浦克美：コンフォメーション病医薬組成物。特願2006-117294、2006年4月20日

堂浦克美、照屋健太、竹中繁織、大塚圭一：異常型プリオン蛋白質濃縮方法、および除去方法。特願2006-071881、2006年3月15日

竹中繁織、大塚圭一、堂浦克美、照屋健太：電気化学的抗原検出法とそのための装置並びに検出チップ。特願2006-65744、2006年3月10日

米国出願中(出願番号未定)、発明者：Hideki Katagiri, Takehide Ogihara, Yutaka Hasegawa, Yoshitomo Oka 発明の名称：Pancreatic \_ cell Regeneration using Myelosuppressive Drugs 出願人：Hideki Katagiri, Takehide Ogihara, Yutaka Hasegawa, Yoshitomo Oka

### 4. その他(研究に関する新聞記事等)

#### 2006年4月11日テレビ報道

テレビ朝日系ニュース Jチャンネル「特集 肥満に対する取り組み」で紹介

#### 2006年6月16日朝刊 新聞報道

朝日新聞 肥満に「体内警告」 東北大教授ら解明 肝臓から脳へ信号  
毎日新聞 肝臓から脂肪燃焼信号 東北大大学院教授らが発見 「やせ薬」に応用も  
読売新聞 脂肪肝から肥満改善指令 東北大院・片桐教授らが明らかに  
産経新聞 肝臓肥満防止に一役 脳に指令 代謝促進—東北大発見

#### 2006年6月16日テレビ報道

ニュース NHK (全国) など

#### 2007年1月12日 新聞報道

科学新聞 「未来のノーベル賞候補者顕彰」 日本学術振興会賞に25氏 臓器間相互作用の意義を初提唱 片桐秀樹・東北大学大学院医学系研究科教授

# 分 担 研 究 報 告

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18年度 分担研究報告書

## 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

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

研究協力者 若尾雅弘 鹿児島大学 大学院理工学研究科・助手

### 1. はじめに

数 nm の大きさを持つオリゴ糖鎖（以下糖鎖）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 [1]。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、構造明確な糖鎖を十分量得ることは困難が伴う。また、糖鎖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糖鎖とその作用相手である蛋白質や細胞、ウイルス等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ツールとして、「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）[2-8]。

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。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；(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、また(v) ナノテクノロジーを用いた新しい測定機器の開発を進めている。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進行状況を報告する。

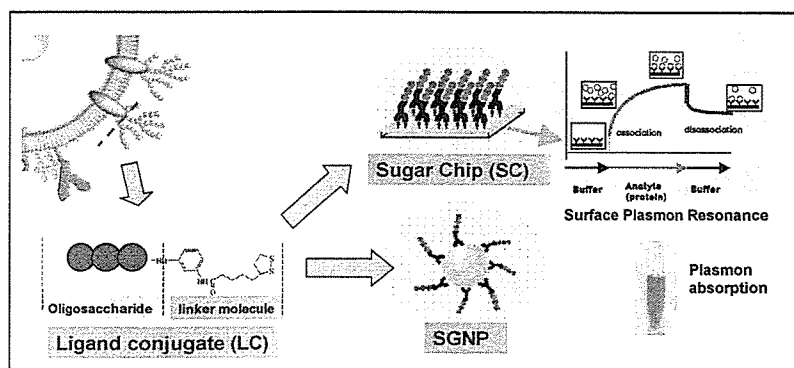
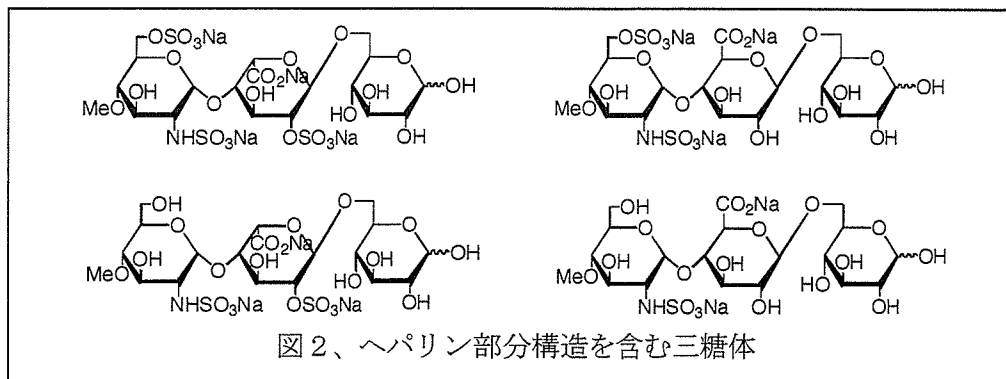


図1 シュガーチップとSGNPのイメージ図

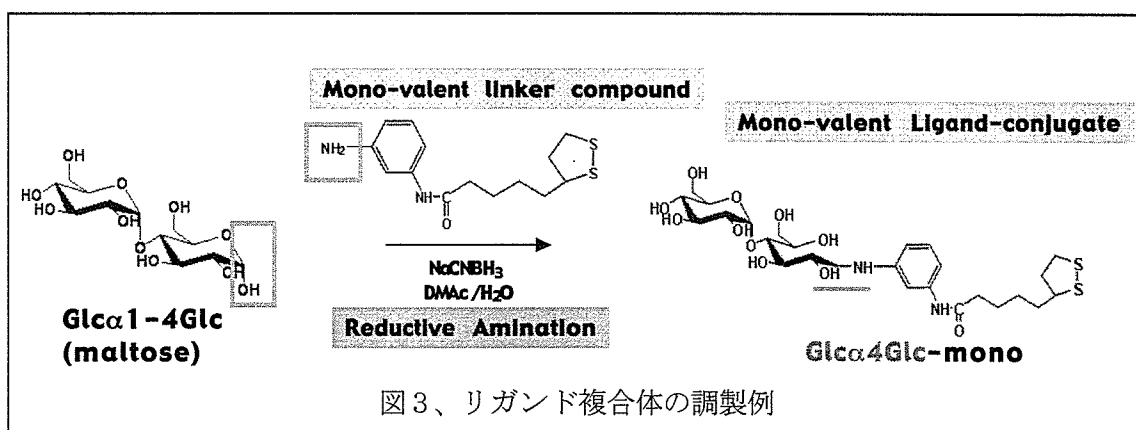
## 2. 硫酸化糖鎖の合成

図 2 に示す、目標のヘパリン部分糖鎖構造 4 種類の合成を達成し、下記のようにリガンド複合体を調製し、昆虫細胞の表面に発現している蛋白質との相互作用の解析に用いた。



## 3. リガンド複合体

金チップに糖鎖を固定化する際に、我々は糖鎖を化学修飾せずに、かつマイルドな条件で固定化することが重要であると考え、還元アミノ化反応を利用した[8]。このために、まずリンカーと称する化合物を多種類合成した。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。現在までに、図 3 の例のように合成した約 70 種類のリガンド複合体を調製した。

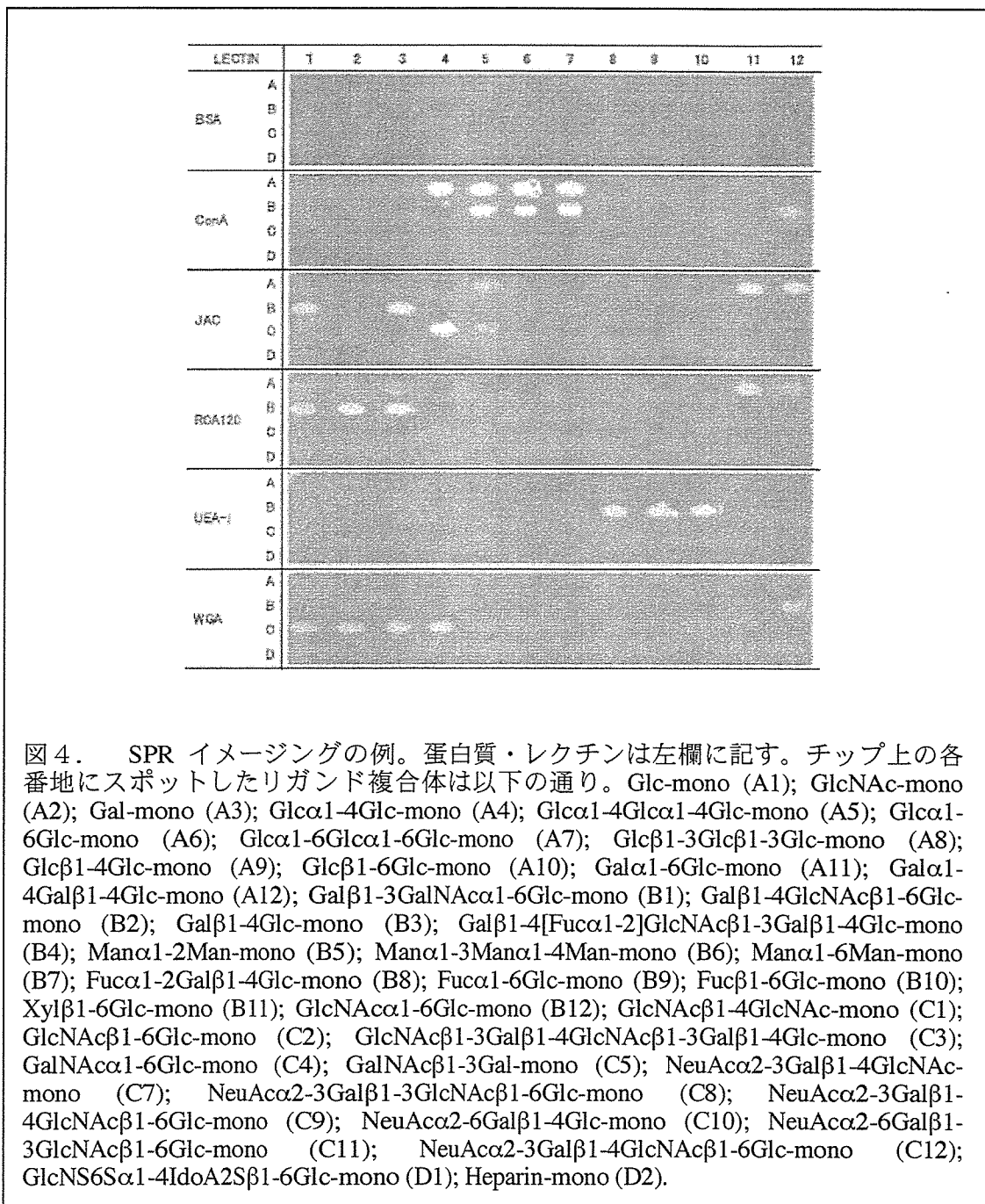


## 4. SPR イメージング用シュガーチップ

蛋白質や細胞、ウイルス等の糖鎖結合性を網羅的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 イメージング用のシュガーチップ調製に用いた。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 個の糖鎖をリガンドとして固定できる。図 2 に 38 種類の糖鎖への 5 種類の蛋白質の結合挙動を調べた結果を示した。それぞれ特異的な糖鎖結合性が観測され、その特異性は従来型の 2 チャンネル型 SPR (SPR-

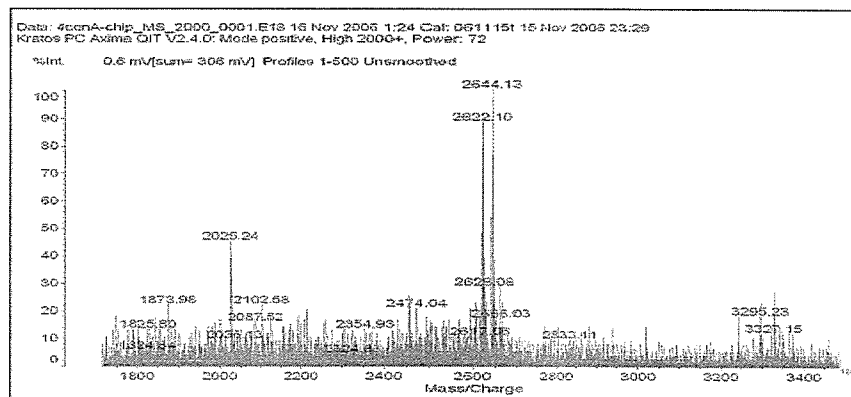


670M)で調べた結果と同様であり、スクリーニング等網羅的解析に用いることが可能であることがわかった。また、図3に示すように、結合の相対強度を定量化することもできた。図3の8種類の糖鎖を固定化したイメージング用シュガーチップは、インフルエンザの分別に関する奥野助教授との共同研究に用いられ、インフルエンザウイルスのトリ型とヒト型の違いや、血清型は同じでも糖鎖結合特性はウイルス毎に異なること等が迅速にわかり、新たな簡便な分別法として応用可能であることを示唆した。



## 5. 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ので蛋白質の種類がわからなくても糖鎖への結合挙動を知ることができる。そのような未知の糖鎖結合性蛋白質を質量分析 (MS) によって同定することを目標として、SPR/MS 連続分析について検討した。昨年は、蛋白質分子質量ピークを感度よく観測する系を構築したので、今年度はシュガーチップ上での蛋白質の酵素分解と、マスフィンガープリント法への適用、並びに酵素分解ペプチドの MS/MS によるアミノ酸シーケンス解析を行った。モデル蛋白質では、それらが可能であることがわかった (図5、6)。現在混合物を選択的に分離、同定することを試みている。



### Mascot Search Results

**User** : Stakahashi  
**Email** : 1128-2006  
**Search title** : lconA-chip\_MS\_2006\_0001.N19-200  
**MS data file** : C:\ADOCHEM\1\mascot\LOCHEM-1\Temp\Dis55.tmp  
**Database** : MSDB 20050929 (2344227 sequences: 779330795 residues)  
**Taxonomy** : Viridiplantae (Green Plants) (195609 sequences)  
**Timestamp** : 28 Nov 2006 at 01:04:27 GMT  
**Top Score** : 71 for HER061, concanavalin a zinc complex, chain B, fragment 1 - jack bean

#### Probability Based Mowse Score

Ions score is  $-10 \cdot \log(P)$ , where P is the probability that the observed match is a random event. Protein scores greater than 55 are significant ( $p < 0.05$ ).

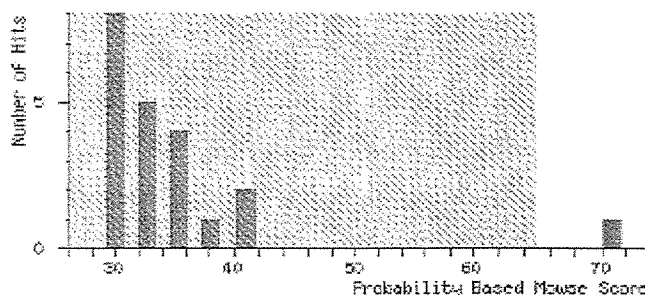
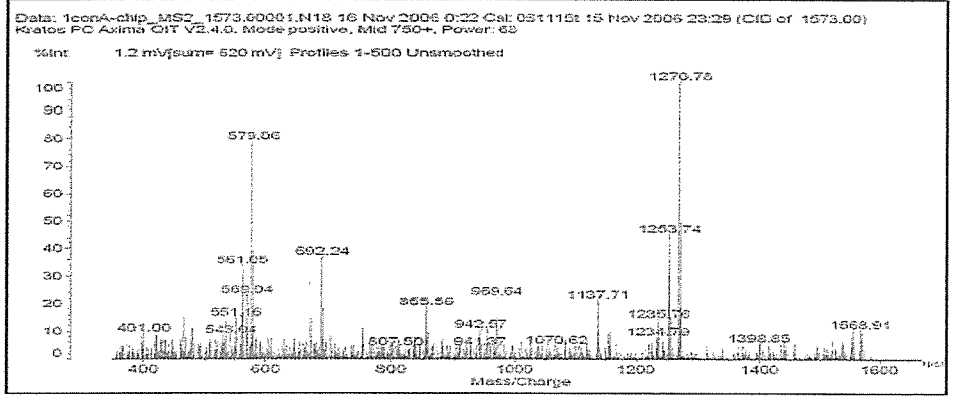
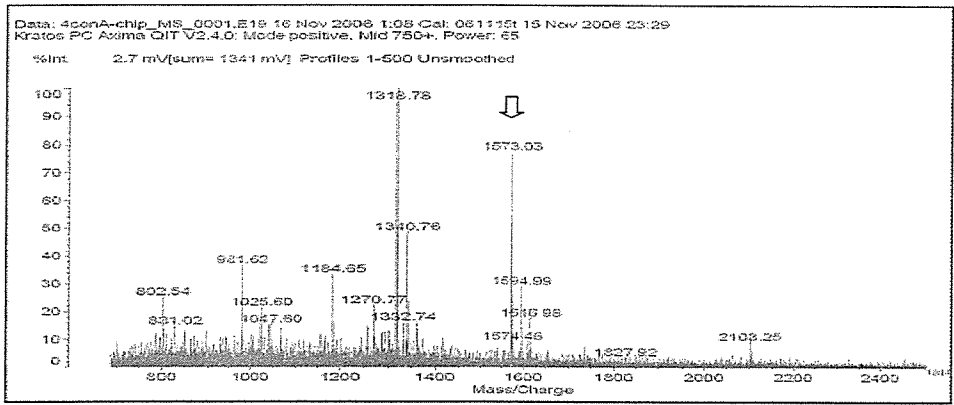


図5. SPR/MS による糖鎖結合性蛋白質 (Concanavalin A) の同定 (マスフィンガープリント法)。AXIMA-QIT による質量分析 (上図) ; マスコットサーチ (下図)。



User : Stakashi  
 Email : 1126-2006  
 Search title : 1conA-chip\_MS2\_1573.00001.N18-100  
 MS data file : C:\DOCUMENT~1\mascot\LOCALS~1\Temp\Dis15.tmp  
 Database : MSDB 20050929 (2344227 sequences: 779380795 residues)  
 Taxonomy : Viridiplantae (Green Plants) (195609 sequences)  
 Timestamp : 26 Nov 2006 at 01:41:55 GMT  
 Significant hits: CVE concanavalin A - jack bean

**Probability Based Mowse Score**

Ions score is  $-10 \cdot \log(P)$ , where P is the probability that the observed match is a random event.  
 Individual ions scores > 25 indicate peptides with significant homology.  
 Individual ions scores > 30 indicate identity or extensive homology ( $p < 0.05$ ).  
 Protein scores are derived from ions scores as a non-probabilistic basis for ranking protein hits.

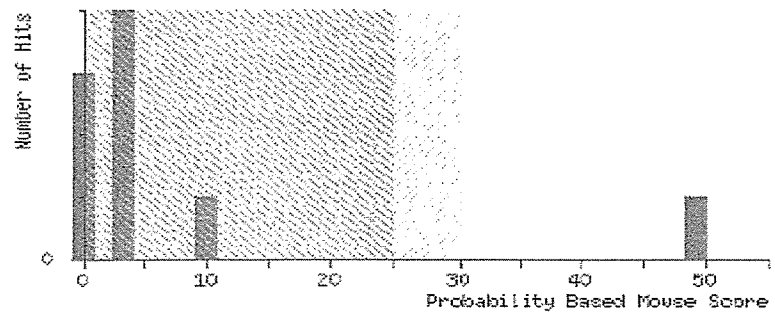
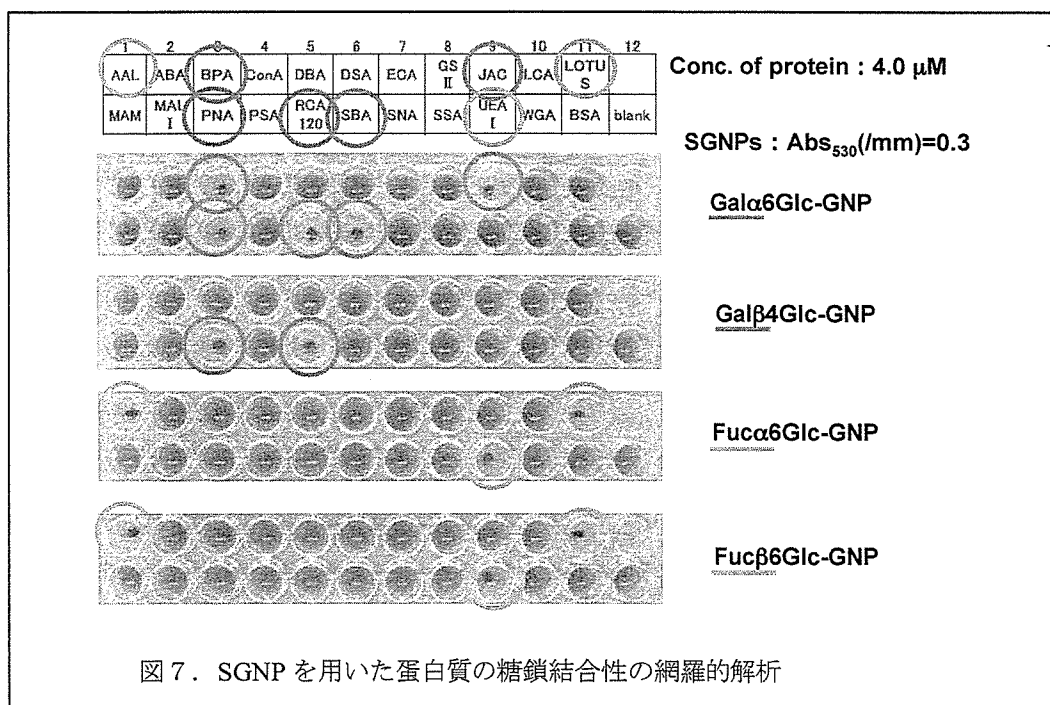


図6. SPR/MS による糖鎖結合性蛋白質 (Concanavalin A) の同定 (MS/MS 法)。AXIMA-QIT による質量分析 (上図); MS/MS (中図); マスコットサーチ (下図)。

## 6. 糖鎖固定化金ナノ粒子(SGNP)

インフルエンザウイルス株の判別などは、戸外やベッドサイドなどのサンプル収集場所で行う on-site 分析が望ましい。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。現在までに 18 種類の SGNP を調製している。図 7 にそのうちの 4 種を用いて蛋白質の糖鎖結合特異性をスクリーニングした結果を示す。多価の結合サイトを持つ蛋白質の場合には、SGNP と混合すると凝集し、SGNP のナノ粒子に依存する赤紫色 (吸収極大: 約 540 nm) が消失するので、目視で蛋白質の糖鎖結合性が判別できることが明らかとなった。また、SGNP はドットブロッキングのプロープとしても使用できた (図 8)。特に、糖鎖結合サイトが 1 つの蛋白質でも、ドットブロットの場合は SGNP によって可視化されるが、凝集は生じないので、蛋白質の糖鎖結合サイトに関する情報も得ることができた。このように、on-site 分析ツールは準備できたので、現在インフルエンザウイルス株の分別に応用中である。



## 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.