

- [3] Sugar-Immobilized Gold Nano-Particles (SGNP): Novel Bioprobe for the On-Site analysis of the Oligosaccharide-Protein Interactions, Suda Y, Kishimoto Y, Nishimura T, Yamashita S, Hamamatsu M, Saito A, Sato M, Wakao M., *Polymer Preprints*, **47**(2), 156-157(2006).
- [4] Immobilization and Clustering of Structurally Defined Oligosaccharides for Sugar Chips: An Improved Method for Surface Plasmon Resonance Analysis of Protein-Carbohydrate Interactions, Suda Y, Arano A, Fukui Y, Koshida S, Wakao M, Nishimura T, Kusumoto S, Sobel M., *Bioconjug Chem.*, **17**(5), 1125-1135 (2006).
- [5] 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
- [6] 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
- [7] 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
- [8] 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. 業績

8-1. 論文・総説

- 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

8-2. 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* lgt 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(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（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（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（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

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

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)

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

プリオン蛋白質とヘパリンの相互作用部位について解析するとともに、糖チップのシステムをもちいたプリオン病の薬剤スクリーニングへの応用の可能性を検討した。その結果、ヘパリンとの相互作用部位がプリオン蛋白質側のN末端ドメインであることが判明した。しかしながらこの部位は、プリオン蛋白質に関して正常型と異常型とを判定する上で指針としているプロテアーゼに対する部分的抵抗性を検定する際に分解を受ける部分であった。このことは、現在確認している相互作用を利用した異常型プリオン蛋白質のチップ上での検出が困難であることを示している。

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。その応用研究が現在進行しているところであるが、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、定性的な評価に限られている。昨年度我々は、リコンビナントプリオン蛋白質を用いて、プリオン蛋白質とヘパリンにおける特徴的な2糖構造とが直接の結合を示すこと(K_d =数 μ M)。その2糖構造が異常型プリオン蛋白質の産生を抑制するのに重要であることを見出

した。今年度は、その作用機序についてさらに検討することを目的とした。すなわち、その2糖構造がいったいプリオン蛋白質のどのような部分と相互作用しているかを明らかにすることによってその意義について考察する。

その一方で、糖チップ-表面プラズモン共鳴の系の応用として、抗プリオン病薬剤スクリーニングでの異常型プリオン蛋白質の検出への利用が可能であるかどうかを検討した。現在我々は薬剤スクリーニングをプリオン病持続感染細胞で評価している。薬剤の評価はプロテイナーゼK処理に対して部分的な分解抵抗性をしめす異常型プリオン蛋白質の薬剤容量依存的な減少を指標としている。その異常型プリオン蛋

白質の量はウエスタンブロットで抗体を用いて検出している。糖チップを用いることによって、この検出部分の効率化と定量化を図ることが期待できる。プリオン病においては、他に診断的マーカーとなるものが無く、診断には異常型プリオン蛋白質を検出しなければならない。検出効率は検出感度に依存しているため、検出感度の向上は重要な意味をもっている。

しかしながら、その実現には異常型プリオン蛋白質のチップへの結合が必要な条件である。そのため、先に述べたプリオン蛋白質側の結合部位の同定はこの点においても明らかにしなければならない課題である。

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三種類の糖チップの供与を主任研究者からうけた。

プリオン蛋白質(マウスの配列、23-231、90-230、121-231、23-89 の 4 種類)は遺伝子組み換え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。各精製蛋白質は質量分析と抗体反応性によって評価したものをを用いた。

細胞はプリオン感染 N2a 細胞(mouse neuroblastoma 由来)と非感染 N2a 細胞を用い、界面活性剤を含むバッファーで溶解させた。

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_{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とウエスタンブロット(以下、WB)から結合分子の推定を行った。また、その結合の様子を追跡をおこなうためチップを洗浄後、結合した物質を酸性アセトニトリルで溶出し、濃縮後 WB 上で定量評価をおこなう(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

1)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。前年度の研究結果として、PrP(23-231)は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大きなセンサーグラムの経時変化が観測され、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。また、チップに結合した分子がプリオン蛋白質であることを同定した。同様の結合実験を、PrP(90-230)、PrP(121-231)を用いて行なったところ、チップ上への有意な結合を示すセンサーグラムは得られなかった。蛋白質濃度は先の実験と同程度に設定した。この結果は、プ

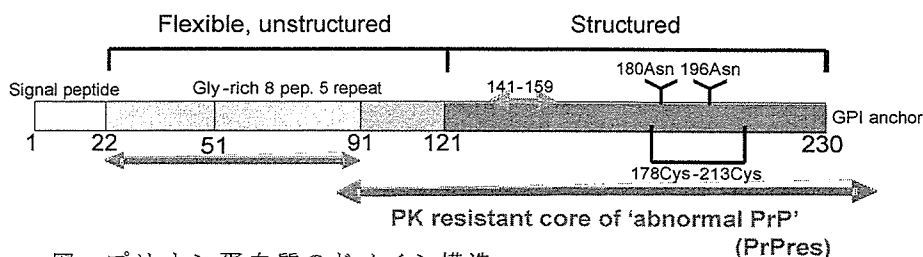


図 プリオン蛋白質のドメイン構造

リオン蛋白質の結合部位が、23-89の領域に存在することを示唆するものであった。そこで、新たに PrP(23-89)を調製し、同様の結合実験をおこなった。その結果、PrP(23-89)は、PrP(23-231)と同程度の解離定数でチップに結合した。速度定数は、PrP(23-231)の場合のそれより大きかった。プリオン蛋白質の51-91の領域は銅イオンとの結合が示唆されているものの、PrP(23-231)と化学量論的に同程度の銅イオンの添加による結合のセンサーグラムに大きな変化は観測されなかった。

2)培養神経細胞の溶解液をロードした場合にも大きなセンサーグラムの上昇が観測された。この変化に関してプリオン感染細胞と非感染細胞とで差違は見られなかった。前年度にこの大きなセンサーグラムの上昇は、リパーゼの添加によって減少することを報告した。そこで、そのセンサーグラムの変化が細胞溶解液のどのような成分に起因するものであるかの検証を行った。追跡する対象としたのは、プリオン蛋白質と脂質である。

非感染細胞の溶解液では、リパーゼを添加したサンプルでは、プリオン蛋白質はWB上で検出できなかった。一

方、プリオン感染細胞ではプロテアーゼ抵抗性を示す領域(図を参照)に相当する移動度のバンドが検出された。このバンドは、リパーゼ処理後プロテイナーゼ K 処理したもの、プロテイナーゼ K 処理後リパーゼ処理したものの両者で同様の結果をした。すなわち、非感染細胞ではプリオン蛋白質は検出されず、感染細胞では、分解抵抗性の移動度をしめすプリオン蛋白質が検出された。

次に、細胞溶解液の溶液条件でプリオン蛋白質が糖チップへの結合を示すかどうか検証した。上記の条件下においても、プリオン蛋白質の添加でセンサーグラムの大きな上昇が観測され、さらに洗浄後チップ上から蛋白質を溶出し濃縮後、プリオン蛋白質を同定、定量した。その結果、十分な強度をしめす時、糖チップ上のプリオン蛋白質の量は、約120ナノグラムであった。

以下の実験で用いた細胞溶解液中には、上記の実験にて結合が強く確認された濃度に相当する濃度(約1/3)のプリオン蛋白質が含まれていることをWB上で確認した。ロードしたサンプル量は、上記の結合実験の4倍量を用いた。

予めプロテイナーゼ K 処理した感

染・非感染の細胞溶解液を、リコンビナントプリオン蛋白質で結合が確認された 2 糖が結合した糖チップへとロードした。その結果、センサーグラムの大きな上昇が両サンプルで見られた。WB 上では、非感染細胞溶解液では、プリオン蛋白質が検出されなかった。感染細胞溶解液ではロード中のパスに、添加した量に相当するプリオン蛋白質が検出された。洗浄後、チップからの蛋白質の溶出液にはプリオン蛋白質は検出されなかった。

次に、感染・非感染細胞溶解液をプロテイナーゼ K 処理せずに、その糖チップ上へとロードした。処理後のサンプルと同様にセンサーグラムの上昇が見られた。両サンプルにおいて、ロードのパスに添加した量に相当するプリオン蛋白質が検出された。十分な糖チップ上への結合をセンサーグラムで確認した後、チップ上でプロテイナーゼ K による消化処理を行った。この処理後のサンプルには、プリオン蛋白質は検出されなかった。糖チップ上の蛋白質を、プロテイナーゼ K 処理前に溶出したサンプルにプリオン蛋白質が痕跡量検出された。

D. 考察

ヘパリンは多様な構造を含んだ高分子化合物である。前年度までにプリオン持続感染細胞を用いた薬剤スクリーニングの結果から、その多様な構造のうち、異常型プリオン蛋白質の産生を抑制するために必要な構造が同定され

た。その結果を受け、そのヘパリン部分構造(代表的な 2 糖構造)と(リコンビナント)プリオン蛋白質とは直接の相互作用があることが示された。そこで、この直接の相互作用については、プリオン蛋白質のどの部分を通して行われているかを検証した。ドメインを N 末端側から削ったプリオン蛋白質を用いて結合実験を行った結果、N 末端側のドメイン PrP(23-89)での相互作用が示唆された。この結合活性の消失がドメイン欠損による可能性があるため、PrP(23-89)を調製して、直接その結合を調べたところ、PrP(23-231)に相当する平衡定数で結合することがわかった。結合・解離の速度定数は、PrP(23-231)のそれらと比べて大きな値を示したが、このことは、分子量が小さくなったことを反映していると考えられる。以上の結果からヘパリンとプリオン蛋白質の結合は、ヘパリン側では代表的な 2 糖構造、プリオン蛋白質では N 末端の 23-89 の領域を通して行われることが明らかとなった。

しかしながら、その 2 糖構造が結合している糖チップに、プロテイナーゼ K による処理を行った細胞の溶解液をロードした場合、感染・非感染によらず、(すなわち、正常型・異常型)プリオン蛋白質の有効な結合は検出できなかった。異常型プリオン蛋白質はロードのパスに検出された。これは、正常型・異常型によらず 23-89 の領域が分解されてチップ上の 2 糖に結合できなかったためだとリコンビナントプリオ

ン蛋白質の実験から推測される。しかし、センサーグラム自体は大きな上昇を示し、かつ感染・非感染によって同様の結合プロファイルを示した。リコンビナントプリオン蛋白質は細胞溶解液の溶媒条件でも結合することから、上記のチップに結合するプリオン蛋白質以外の細胞成分の存在を示している。また、市販のリパーゼを用いるとセンサーグラムの上昇は見られなかったが、正常型プリオン蛋白質は分解され、異常型プリオン蛋白質も上記に述べた理由から糖チップへ結合できない部分構造へとトリミングされると思われる。これらの蛋白質分解は、リパーゼ製品に混在しているプロテアーゼ類のためだと考えられる。リパーゼ処理後のサンプル中の脂質を薄層クロマトで分析したところ反応は進行しているが、十分な進行度ではなかった(目視で 20% 進行程度)。リパーゼ溶液添加によってセンサーグラムがほぼベースラインにまで下降したという観測と合わせると、その要因は脂質ではなく、むしろ蛋白質成分であったことが推測される。したがってリパーゼの適応は困難である。

プロテアーゼ K 処理していない試料についても、プリオン蛋白質の有効な結合が観測できなかった。先に述べた、細胞溶解液中の 2 糖へ結合する成分との競合によってプリオン蛋白質の結合が阻害されると考えられる。センサーグラムも先の実験と同様に大きな上昇を示したが、この系においても、感染・

非感染で結合プロファイルに差は見られなかった。非感染細胞においては、非常に少量ではあるものの、結合した痕跡が見られたことを追記する。

プリオン病の診断や、薬剤スクリーニングの実施を計画する上で、プリオン蛋白質の正常型と異常型とを区別をつけるステップは必要不可欠である。しかし、異常型でプロテアーゼ部分抵抗性を示すのはプリオン蛋白質の C 末端側のドメインである(図を参照)。これまでリコンビナントプリオン蛋白質をもちいて示してきた糖チップとの相互作用をそのまま利用した薬剤スクリーニング系の確立は、結合の競合および、結合位置という二つの点で困難である。

細胞溶解液ではヘパリン部分構造への十分な結合、すなわち直接の相互作用、を観測することができなかったことと、持続感染細胞で薬効を示したという結果の乖離についての説明は、更なる検討が必要である。感染細胞での薬剤スクリーニングは、37℃で数日間添加するため、痕跡量程度の相互作用で十分である可能性や、添加したヘパリンが細胞へ取り込まれ効力を発揮する可能性や、第二の因子の活性化といった可能性を残している。

培養細胞系でのヘパリンの挙動はまだ不明な点があるものの、ヘパリン代表的部分構造の二糖が抗プリオン病薬剤研究ための重要なリードと成り得る。薬剤開発へと展開するためには、ヘパリン代表的部分構造の二糖と細胞での

ヘパリンとプリオン蛋白質との相互作用を明らかにすることが必要である。

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示し、薬効と関連がある。その2糖構造は、プリオン蛋白質のN末端側(23-89)と結合する。細胞溶解液中の正常型・異常型プリオン蛋白質との有効な結合を観測できなかった。リコンビナントプリオン蛋白質で同定したヘパリンとの結合領域は、プリオン蛋白質の正常・異常で区別がつかない領域であり、チップ上での両者の区別は困難である。

F. 健康危険情報
なし

G. 研究発表

1. 論文発表

1. 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)
2. 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
3. Ishikawa K, Kudo Y, Nishida N,

Suemoto T, Sawada T, Iwaki T, Doh-ura K: Styrylbenzoazole derivatives for imaging of prion plaques and treatment of transmissible spongiform encephalopathies. *J. Neurochem.*, 99:198-205 2006

4. 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.
5. 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.
6. 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.
7. 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
8. 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
9. 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

10. 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

2.学会発表

1. Doh-ura K: Therapeutic strategies for prion diseases. SFB-596 Meeting for Molecular Mechanisms of Neurodegeneration, Munich, October 16, 2006
2. Tsuboi Y, Doh-ura K, Yamada T: Experimental treatment with intraventricular pentosan polysulphate injection in prion disease. TheraPrion 2006, Paris, November 21, 2006
3. 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
4. Sakasegawa Y, Doh-ura K: Aggregation and degradation of cellular prion protein by Novobiocin. NeuroPrion 2006, Torino, October 3-6, 2006
5. 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
6. 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
7. 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
8. 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
9. 堂浦克美 : プリオン病の治療戦略を展望する —即戦力的方略—. 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
10. 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
11. 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
12. 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
13. 堂浦克美、魚本幸、西澤桂子、川崎ゆり、伊波真彦 : Prophylactic effect of dietary seaweed fucoïdan against

enteral prion infection. 2006 年プリオン研究会、安比高原、2006 年 9 月 2、3 日

14. 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

15. 石川謙介、木村朋寛、工藤幸司、西田教行、岩城徹、堂浦克美：Styrylbenzoazole 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

16. 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

17. 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

18. 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

1. 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

2. 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

3. 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

H. 知的所有権の出願・登録状況

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

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とそれに関連した合併症発症の機序の解明と早期診断法・根治治療法の開発を目標として、本研究を進めている。肥満・糖尿病については、動物実験により、過栄養時に、基礎代謝を亢進させることで肥満・糖尿病の発症を防ぐ恒常性維持機構が体内に備わっていることを見出した。この機構には、自律神経系のネットワークが関与しており、新しい治療法開発のターゲットになりうるものと考えられる。次に、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。東北大学病院に通院する糖尿病患者のうち、重症合併症を併発している症例を選択し、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、それぞれの合併症でその糖鎖結合蛋白の検出パターンに変化が出る傾向を認めている。来年度は、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。

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。肥満に基づくインスリン抵抗性は、耐糖能異常（糖尿病）、高血圧、高脂血症をしばしば合併し、これらをまとめた概念は、メタボリックシンドロームとして注目を大きく集めている。メタボリ

ックシンドロームは、40歳以上の男性の約半数が該当し、現在の最も頻度の高い慢性疾患となっている。メタボリックシンドローム患者は動脈硬化を発症しやすく、動脈硬化性疾患はわが国の主要な死因となっていることも注目を集める理由である。さらに、糖尿病は、細小血管にも障害を起し、細小血管合併症として、網膜症・腎症・神

経障害を生ずる。これらの合併症は、現在根治治療はなく、これらの患者の急激な増加は、失明や人工透析などの重篤な合併症は、医療・福祉の点からも、医療経済の点からも重大な社会問題となっている。特に、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、肥満や過栄養状態で、膵β細胞における糖鎖修飾に変化が生じることが報告されており、このような栄養状態の変化は、全身の各組織でさまざまな糖鎖修飾およびそれを認識する蛋白の変化を起こしうるものと考えられる。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肝臓に、アデノウイルスを用いて遺伝子導入を行い、脂肪肝を誘発させ、その全身の各組織での代謝状態に与える影響を検討し、体内に備わった過栄養時のフィードバック機構を解明する。

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. 自律神経ネットワークによる肥満・糖尿病予防機構の解明
食事性肥満・糖尿病モデルマウスの肝臓へ、アデノウイルスを用いて、

PPAR_αの遺伝子導入を行い、実験的に急速に脂肪肝を誘発させたところ、末梢脂肪組織が縮小した。脂肪組織の縮小は脂肪分解によるもので、基礎代謝は増加を示した。また、脂肪肝が増悪しているにもかかわらず、血糖値の低下・耐糖能の改善・インスリン抵抗性の改善を認めた。このように、肥満・糖尿病の状態を改善する機構が体内に内在し、急速な脂肪肝の誘導により、この機構が働いていることを示す結果を得た。

そこで、この内在する肥満・糖尿病改善機構を詳細に検討した。交感神経β作用を遮断すると、脂肪肝誘導時の脂肪組織における脂肪分解が抑えられること、肝からの迷走神経切断や同神経の求心路遮断を行っておくと、PPAR_αの遺伝子導入による脂肪肝誘導には変化がないにもかかわらず、基礎代謝の増加・糖尿病や肥満の改善などの肝以外の臓器・組織への影響は、完全に抑制され、これらの肝から他臓器・組織への効果は、迷走神経求心路・交感神経遠心路という、自律神経ネットワークにより、伝えられることが明らかとなった。

脂肪肝は、元来、栄養摂取過多によっておこる生活習慣病の一つである。また、様々な実験動物モデルにより、肝でのPPAR_αの発現は、過栄養によって誘発され、脂肪肝を惹起する機序として重要であると考えられている。つまり、我々の得た結果から、肝臓はエネルギー蓄積状態のセンサーとして働き、過栄養状態を

感知して迷走神経を介して脳にその信号を送っていることが想定される。脳は、その情報を基に、交感神経を活性化させることにより、脂肪の燃焼・基礎代謝の増加を誘導し、過栄養状態により生じる肥満を予防・改善させている。このような、過栄養に対して、肥満・糖尿病を予防する機構が体には備わっていて、それには自律神経ネットワークが重要な役割を果たしているということが発見された。本機構を活性化する薬剤などの開発は、全く新しい視点からの肥満・糖尿病の治療法となる可能性があるものと期待される。

2. 糖尿病患者における糖鎖結合蛋白の変化の検討

東北大学医学部・医学系研究科倫理委員会での、患者血清を用いる本研究の承認に基づき、検討を行っている。まず、東北大学病院糖尿病代謝科通院の糖尿病患者のうちから重症の糖尿病性合併症をもつ患者と合併症を有しない糖尿病患者を、それに加えて、糖尿病を有しない健康者の血液を採取し、血清を用いてシュガーチップでの糖鎖結合蛋白のパターン検討を行った。さらに、アーチファクトなどの影響を排除するため、サンプルの調整の際にヘパリンの有無・デキストラン硫酸の有無による結合蛋白の違いを検討し、サンプル調整の最適化を行った。夏季に示すように、正常者と合併症を有する糖尿病患者との間に、糖鎖結合蛋白質のパターンに違いがある傾向を認めたが、特に糖尿病患者間において個人差が認められ、血液採取時の条件（時刻・血

糖値・食事との関連など)を揃えてさらに検討を進める必要があるものと考えられた。

＜シュガーチップ解析の実際例＞

上からそれぞれ重症神経障害、網膜症を有する糖尿病症例、健常者の一例

No.3 (神経障害)	A	
	B	
	C	
	D	
No.21 (網膜症)	A	
	B	
	C	
	D	
SP-3 (健常人)	A	
	B	
	C	
	D	

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、Science誌に掲載され、Cell Metabolism誌などのpreviewでも紹介され、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。我々は昨年度もレプチン感受性を改善する自律神経シグナルについて報告しており、これらの自律神経ネットワークの全身における代謝調節における意義は大きいものとする。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、合併症の進行に伴い特異的に変化する有意な結合蛋白を同定することを目指す。また、最近、膵β細胞におけるインスリン分泌とGLUT2糖輸送担体の糖鎖修飾との間の関連が報告され、肥満時の反応性インスリン分泌の低下との因果関係が示唆されている。そこで、肥満・糖尿病のモデル動物を用いて、膵β細胞における糖鎖結合蛋白の量的変化を検討し、インスリン分泌における糖鎖結合蛋白の意義を確かめる予定である。大きく変化するパターンを認めることが出来れば、本手法に質量分析を組み合わせることで、直接、結合蛋白を同定できる可能性がある。さらに、肥満患者と非肥満患者の血清における糖鎖結合蛋白のパターンをシュガーチップを用いて検討することも予定している。これらにより、肥満時におけるインスリン分泌低下の機序を解明し、治療法開発につなげる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ている。

F. 研究発表

1. 論文発表

- 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 Ca²⁺ 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 β -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., 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.
- 2. 学会発表（シンポジウムなど）
 - 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13 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 11th 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 α -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

G. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

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 α -cell Regeneration using Myelosuppressive Drugs 出願人：Hideki Katagiri, Takehide Ogihara, Yutaka Hasegawa, Yoshitomo Oka

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

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

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、GM2 類縁体の系統的合成、新奇な構造であるフコシル α -(1-4)/(1-8)シアル酸構造の構築に成功した。また、従来法を応用してガングリオ系ガングリオシド糖鎖含有プローブの合成を達成した。

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、様々なタンパク質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. GM2 類縁体の合成と酵素分解機構の解明

GM2 の酵素加水分解には、当該酵素のみならず、それを補助するタンパク質（GM2 活性化因子）の存在が必須である。その作用機構を明らかにするために、糖鎖構造の異なる GM2 類縁体を系統的に合成し、酵素加水分解試験に供した。その結果、非還元末端 3 糖エピソードの構造が重要であり、還元末端グルコースならびに脂質部分に対する構造要求性は厳密ではないことが明らかになった。