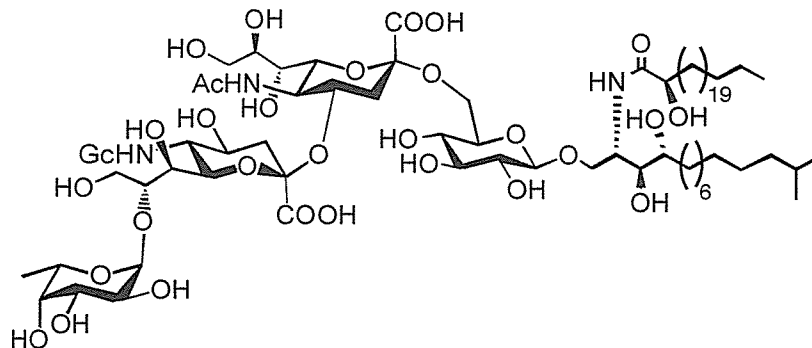


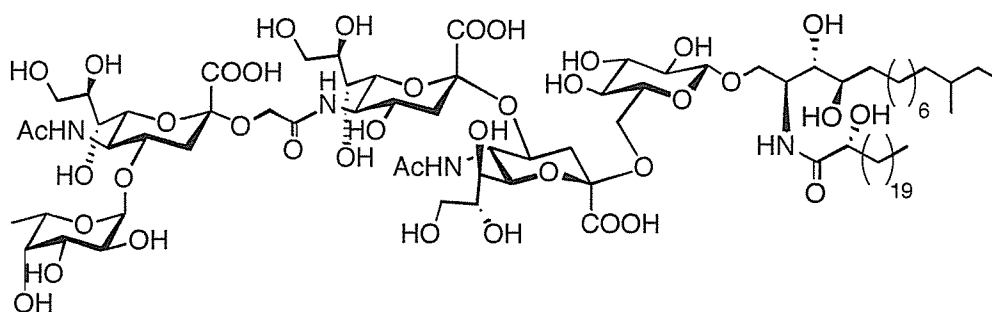
GM2

## 2. 棘皮動物由来ガングリオシド部分構造の構築

棘皮動物には、高等動物には見られないユニークなガングリオシドが存在する。そのうち HPG シリーズガングリオシドはシアル酸の 4 位もしくは 8 位の水酸基にさらにフコースが結合した構造をしている。本研究ではラクタム型シアル酸を糖受容体とする新たな方法論を用いて、その合成を高収率にて達成した。



ガングリオシド HPG-1

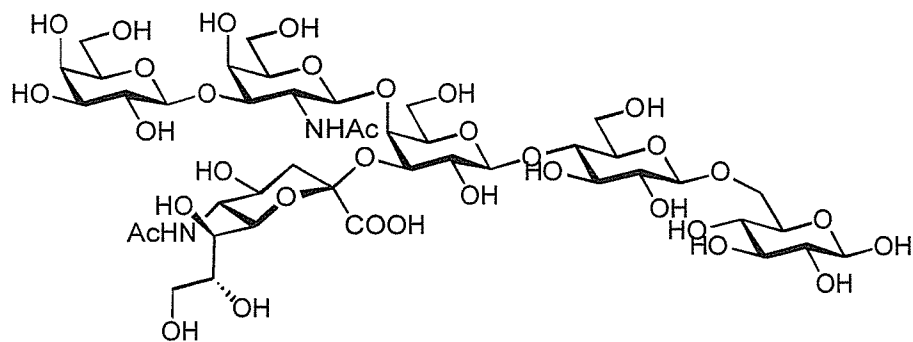


ガングリオシド HPG-7

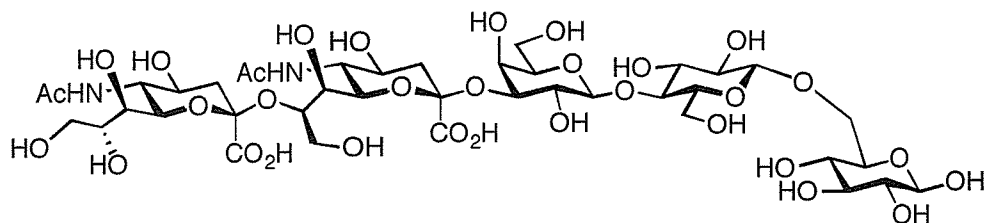
## 3. ガングリオ系ガングリオシド糖鎖を含有するプローブの合成

ガングリオ系ガングリオシドは脳などの神経系に存在し、神経機能への重要な関与が明らかにされている。我々は既に種々のガングリオ系ガングリオシドの合成を達成しているが、本研究では、ゲンチオビオースを誘導体を還元末端に用いる新たな合成経路を開発し、GM4, GM3, GM2, GM1, GD3 糖鎖を含む、Sugar Chip 用糖鎖プ

ローブを合成した。



GM1 プローブ



GD3 プローブ

## C. 研究発表

### 1. 論文発表

1. Imamura, A., Kimura, A., Ando, H., Ishida, H., Kiso, M.: Extended applications of Di-*tert*-butylsilylene-Directed  $\alpha$ -Predominant galactosylation compatible with C2-Participating groups toward the assembly of various glycosides. *Chem. Eur. J.*, **12**, 8862-8870, 2006,
2. Kimura, A., Imamura, A., Ando, H., Ishida, H., Kiso, M.: A novel synthetic route to  $\alpha$ -galactosyl ceramides and iGb3 using DTBS-directed  $\alpha$ -selective galactosylation. *Synlett*, **15**, 2379-2382, 2006.
3. Sawada, T., Hashimoto, T., Nakao, H., Shigematsu, M., Ishida, H., Kiso, M.: Conformational study of  $\alpha$ -N-acetyl-D-neuraminic acid by density functional theory. *J. Carbohydr. Chem.*, **25**(5), 387-405, 2006.
4. Sawada, T., Hashimoto, T., Nakao, H., Suzuki, T., Ishida, H., Kiso, M.: Why does avian influenza A virus hemagglutinin bind to avian receptor stronger than to human receptor? Ab initio fragment molecular orbital studies. *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, **351**, 40-43, 2006.
5. Fuse, T., Ando, H., Imamura, A., Sawada, N., Ishida, H., Kiso, M., Ando, T.: Synthesis and enzymatic susceptibility of a series of novel GM2 analogs. *Glycoconjugate J.*, **23**,

- 329-343, 2006.
6. Makimura, Y., Watanabe, S., Suzuki, T., Suzuki, Y., Ishida, H., Kiso, M., Katayama, T., Kumagai, H., Yamamoto, K.: Chemoenzymatic synthesis and application of a sialoglycopolymer with a chitosan backbone as a potent inhibitor of human influenza virus hemagglutination. *Carbohydr. Res.*, **341**, 1803-1808, 2006.
  7. Ando, H., Shimizu, H., Katano, Y., Koike, Y., Koizumi, S., Ishida, H., Kiso, M.: Studies on the  $\alpha$ -(1 $\rightarrow$ 4)- and  $\alpha$ -(1 $\rightarrow$ 8)-fucosylation of sialic acid for the total assembly of the glycan portions of complex HPG-series gangliosides. *Carbohydr. Res.*, **341**, 1522-1532, 2006.
  8. Takaku, H., Sato, J., Ishida, H-K., Inazu, T., Ishida, H., Kiso, M.: A chemical synthesis of UDP-LacNAc and its regioisomer for finding 'oligosaccharide transferases'. *Glycoconjugate J.*, **23**, 565-573, 2006.
  9. Attrill, H., Takazawa, H., Witt, S., Kelm, S., Isecke, R., Brossmer, R., Ando, T., Ishida, H., Kiso, M.: The structure of Siglec-7 in complex with sialosides: leads for rational structure-based inhibitor design. *Biochemical J.*, **397**(2), 271-278, 2006.
  10. Magesh, S., Suzuki, T., Miyagi, T., Ishida, H., Kiso, M.: Homology modeling of human sialidase enzymes NEU1, NEU3 and NEU4 based on the crystal structure of NEU2: Hints for the design of selective NEU3 inhibitors. *J. Mol. Graph. and Mode.*, **25**, 196-207, 2006.

## 2.学会発表

1. 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。
2. 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。
3. 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。
4. 吉川武、加藤裕貴、石田秀治、木曾真：GM1epitipe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。
5. 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。
6. 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。
7. 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

- 群発症に關与する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。
8. 澤田敏彦、安藤弘宗、石田秀治、木曾真：インフルエンザウイ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。
  9. 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。
  10. 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。
  11. 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。
  12. 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。
  13. 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.
  14. Sato, T., Ozawa, K., Imamura, A., Ando, H., Ishida, H., Kiso, M. : Di-*tert*-butylsilylene-Directed  $\alpha$ -Selective Synthesis of 4-Methylumbelliferyl T-antigen and p-Nitrophenyl T-antigen analogs. XXIII International Carbohydrate Symposium, Whistler, Canada, July 23-28 2006.
  15. 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.
  16. 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。
  17. 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.

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

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 奥野壽臣 兵庫医科大学・助教授

### 研究要旨

インフルエンザウイルスのシアル酸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。各種ウイルス株結合の定量的な解析を行い、株間の相違を結合パターンにより差別化出来るか否かを検討した。また、シアル酸結合金ナノ粒子とウイルスとの凝集についても検討した。

#### A. 研究目的

インフルエンザウイルス（Flu）はこれまで何度も世界的大流行を引き起こし、多数の犠牲者を出してきた。特に1918年に流行が始まったスペイン風邪は全世界で2500～4000万人の死亡者を生じ、これは短期間の犠牲者数としては、戦争も含め有史以来最悪となっている。その後Fluは何度か型を変え、その都度世界的大流行を起こしてきたが、ここ40年間は同じ型が流行してきたため、最近は新型Fluの出現が懸念されている。その様な状況下、数年前から新型のトリFluが出現し、人間に感染して問題となっている。感染者の致死率は50%以上で、もしこのトリFluが世界的大流行した場合、その犠牲者は数億人に達すると予想されている。そのため現在、予防法と治療法の開発が精力的に行なわれている。もちろんそれらは最も重

要なことであるが、それらを効率的に運用できるか否かはトリとヒトのFluを出来るだけ早期に診断出来るかどうかにかかっている。トリとヒトのFluは細胞表面に存在するシアル酸に結合して細胞に感染するが、トリのFluはシアル酸が次のガラクトースと2-3結合している糖鎖（SA23）、ヒトのFluは2-6結合している糖鎖（SA26）に特異的に結合することが知られている。我々はシアル酸を含む種々の糖鎖を結合させたチップや金ナノ粒子とFluとの結合を解析して、それらの診断に応用できるか否かを調べることを目的としてこの研究を行なう。

#### B. 研究方法

##### 1. 使用ウイルス：

##### H1N1型Flu

A/Beijing/262/95、A/Osaka/7/2006、  
A/Osaka/39/2006、A/Osaka/40/2006

### H3N2 型 Flu

A/Aichi/2/68 、 A/Fukuoka/1/70 、  
A/Guizhou/54/89、A/Kitakyushu/159/93、  
A/Memphis/1/71 、 A/Niigata/102/81 、  
A/Panama/2007/99 、 A/Sydney/5/97 、  
A/Tokyo/6/73 、 A/Wyoming/3/2003 、  
A/Yamanashi/2/77 、 A/Osaka/6/2006 、  
A/Osaka/10/2006 、 A/Osaka/11/2006 、  
A/Osaka/24/2006

### H2N2 型 Flu

A/Okuda

### トリ Flu

A/Duck/HK/2415/76(H3N2) 、  
A/Duck/313/4/78(H5N3)

2.シュガーチップ：シアル酸を含む各種オリゴ糖（下記の①～⑧）を固着させた基盤（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：シアル酸を含むオリゴ糖（下記の⑧）を固着させた金ナノ粒子を作成し、ウイルスを添加したのち遠心し、その沈澱パターンを観察した。

4.オリゴ糖鎖：

- ① Ga β 4Gc-mono
- ② Ga β 4GcNAc β 6Gc-mono
- ③ SA23Ga β 4Gc-mono
- ④ SA26Ga β 4Gc-mono
- ⑤ SA23Ga β 3GcNAc β 6Gc-mono
- ⑥ SA26Ga β 3GcNAc β 6Gc-mono
- ⑦ SA23Ga β 4GcNAc β 6Gc-mono
- ⑧ SA26Ga β 4GcNAc β 6Gc-mono

### C. 研究結果

トリ細胞（有精卵）に馴化したウイルス株（Okuda）とトリ型ウイルスは SA23 に強く結合し、ヒトの分離株の一部（H3N2: Fukuoka, Gouzhou, Kitakyushu, Memphis, Panama, Tokyo）は SA26 に強く結合した。しかし、他の株（H1N1: Beijing, Osaka/7, Osaka/39, Osaka/40; H3N2: Aichi, Niigata, Sydney, Wyoming, Osaka/6, Osaka/10, Osaka/11, Osaka/24, Tokyo）では SA23 と SA26 の両方に同程度の結合を示した。

低速遠心沈澱（3000rpm/min）において、Memphis 株は 2<sup>7</sup>/ml HA 単位で金ナノ粒子を凝集することによって沈澱させたが、Okuda 株は 2<sup>11</sup>/ml HA 単位以上の量でないと沈澱させなかった。

### D. 考察

ヒト型 Flu のいくつかは SA26 への結合が有意にみられたが、その他のヒト型 Flu では明らかな傾向は見られなかった。さらに多くの臨床分離株を用いた解析が必要であると思われる。これに反し、トリ型 Flu は SA23 への結合が有意であったので、ヒト型とトリ型の区別には有効であるかもしれない。凝集法によってもヒト型とトリ型の間に明らかな差が見られたので、この方法はそれらの迅速な鑑別に有用となり得る可能性があり、これもさらに検体数を増やして解析する必要がある。

### E. 研究発表

#### 1.論文発表

- 1) 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.

2) 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 chorioretinopathy の 1 例. 眼科, 48: 1853-1858, 2006.

3) 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.

## 2.学会発表

1) 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.

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

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ることにより、糖鎖構造に基づ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、昨年度に提案したてんかん関連糖鎖構造に反応する内在性レクチンの検索を試み、てんかん発症に連動して著しい発現の亢進を示す内在性レクチンの存在を明らかにした。

### 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、てんかんだけでなく、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、昨年度に提案したてんかん関連糖鎖構造を含む48種の糖鎖



構造に反応する内在性レクチンの検索を試みた。

## B. 研究方法および結果

### B-1. 方法

#### B-1-1. てんかんモデルマウス作成

8週令オス DDY マウスを購入し、1週間の輸送ストレス除去の後、てんかんモデルマウスを作成した。マウスは、イソフルラン麻酔下で脳固定台に固定後、扁桃体にマイナス電極 [berga: 後方-2 mm, 右側 3 mm, 深部 4.5 mm] を頭蓋骨下にプラス極 [berga: 前方-1.5 mm, 左側 1.5 mm] を挿入後、電極は歯科用セメントにより固定した。1週間の手術ストレスを除いた後、一日一度、軽微な刺激(450-700  $\mu$ A, 200  $\mu$ sec duration, 60Hz, 2sec) を行い、約 4 週間かけて、てんかんモデルマウスを作成した。

#### B-1-2. マウス脳ホモジネート調整とシュガーチップへの適用

てんかんモデル(kindling)マウス、手術後未刺激(sham)マウス、未処理(control)マウスから、大脳皮質前部領域、大脳皮質後部と海馬領域、視床領域の 3 領域に分け、それぞれを 20 mM Tris-HCl, pH 7.4, 0.15 M NaCl 中でホモジネート後遠心分離を行った。その上清を可溶性画分(A)とし、その沈渣を 20 mM Tris-HCl, pH 7.4, 0.2% Triton X-100 により、再びホモジネート後遠心分離を行い、その上清を Triton 画分(T)とした。

各画分を 200  $\mu$ g/ml に調整後、48 種の糖鎖構造を持つシュガーチップ (SPR: surface Plasmon resonance) に 4 分間循環添加後、20 mM Tris-HCl, pH 7.4, 0.15 M NaCl, 0.1% Triton X-100 にて 20 秒間洗浄後、検出した。

### B-2. 結果

大脳皮質前部領域、大脳皮質後部と海馬領域、視床領域の 3 領域でてんかんモデルマウス特異的に発現上昇を示した糖鎖構造について記す。

予備実験の結果より、Con A (分子量 10.4kDa)の特異的糖鎖 (Glc( $\alpha$ 1-6)Glc, Man( $\alpha$ 1-6)Man) への結合値が、 $\delta R$ =ca. 100; WGA(分子量 50 kDa)の特異的糖鎖 (GlcNAc( $\alpha$ 1-6)Glc, GalNAc( $\alpha$ 1-6)Glc) への結合値が、 $\delta R$ =ca. 50 であった。すなわちシュガーチップで得られるシグナル強度は、 $\delta R$ =50 付近あるいはそれ以上の値である場合、特異性を示していると考えられる。そこで、本実験での未同定・内在性レクチンについては分子量が不明ではあるが、少なくとも  $\delta R$ =50 付近あるいはそれ以上のシグナル強度を示す糖鎖構造に注目することとした。

#### B-2-1. 大脳皮質前部領域

てんかん可溶性画分において、Le(x)が、sham の 4 倍のシグナル強度 ( $\delta R$ ) を示し、このときの kindling 可溶性画分は  $\delta R$ =42.3 であった。一方で、てんかん可溶性画分及び Triton 画分共に結合量の増強が観察されたの

は、Sia( $\alpha$  2-6)Gal( $\beta$  1-3)GalNAc( $\alpha$  1-6)Glc であり、sham の 3 倍であった。またこのときのてんかん Triton 画分は  $\delta R=68.9$  であった。

#### B-2-2. 大脳皮質後部と海馬領域

この領域では、てんかんに連動して結合量の増強を示した糖鎖構造は観察されなかった。

#### B-2-3. 視床領域

視床領域で増強の観察された糖鎖構造はすべて、てんかん可溶性画分及び Triton 画分共に観察された。その内訳は、Le(x)が、3.4 倍(てんかん Triton 画分  $\delta R=64.0$ ); GalNAc( $\alpha$  1-6)Glc で、5.7 倍(てんかん Triton 画分  $\delta R=50.7$ ); Sia( $\alpha$  2-3)Gal( $\beta$  1-4)Glc ( $\beta$  1-6)Glc で、6.1 倍(てんかん Triton 画分  $\delta R=23.1$ ); Sia( $\alpha$  2-3)Gal( $\beta$  1-4)GlcNAc( $\alpha$  1-6)Glc で、7.1 倍(てんかん可溶性画分  $\delta R=69.1$ )まで亢進していた。特に、最後の Sia( $\alpha$  2-3)Gal( $\beta$  1-4)GlcNAc( $\alpha$  1-6)Glc は、最も  $\delta R$  値が高いうえ、てんかん増強率も高かった。この構造は、本申請者が以前、明らかにしたてんかん誘導関連・シアル酸転移酵素(ST3Gal IV)によりシアル酸修飾を受ける糖鎖構造であった。このことは、てんかん誘導により発現上昇を示した ST3Gal IV によりシアル酸化された糖鎖構造を認識する内在性レクチンが、てんかん誘導に連動して発現の亢進を示したものと考えられた。

#### C. 考察及び結論

以前に、本研究で利用したてんかんモデルマウスの視床において、てんかん誘導に連動して著しい発現上昇を示すシアル酸転移酵素(ST3Gal IV)を見つけていた。また *In vitro* の実験より、本酵素の基質特異性は、2 型のラクトサミン構造にシアル酸を付加するもので、結果として Sia( $\alpha$  2-3)Gal( $\beta$  1-4)GlcNAc が合成されることが知られている(Kono, M. et al. *Glycobiology* 7:469-479)。この報告を元に昨年度は、Sia( $\alpha$  2-3)Gal( $\beta$  1-4)GlcNAc( $\alpha$  1-6)Glc 構造のシュガーチップへの提案を行っていた。そして本年度における研究で、実際にてんかんマウスとコントロールとの比較を行ったところ、Sia( $\alpha$  2-3)Gal( $\beta$  1-4)GlcNAc( $\alpha$  1-6)Glc の反応性が最も高く、先の ST3Gal IV の基質特異性と一致するものであった。このことは、てんかん誘導に連動して視床内では、ST3Gal IV  $\rightarrow$  Sia( $\alpha$  2-3)Gal( $\beta$  1-4)GlcNAc $\rightarrow$ 内在性レクチン〔未同定〕の発現がそれぞれ上昇したことを直接示したことになり、これら 3 つの分子によるてんかん誘導への強い関連性を示唆している。

今回発現亢進を観察した内在性レクチンが、実際にどのようにてんかん誘導に関連するのかを明らかにするためには、この内在性レクチンを同定する必要があり、来年度は、先のシュガーチップに加え、隅田らの開発した SGNP も利用する予定である。D. 研究

発表

論文発表 (総説)

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

総説出版物の企画編集 (言語：英語)

雑誌タイトル： CNS & Neurological Disorders - Drug Targets

企画タイトル： Glycobiological approach to neurological disorders

(出版社： Bentham Science Publishers; 2006年8月号)

学会等発表

1. 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
2. Sekino S, Yoshio Hirabayashi<sup>2,3</sup>, Kazuyuki Yoshida<sup>2,4</sup>, Toshiya Okada<sup>1</sup>, and Keiko 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
3. Kato K Molecular dynamics in kindling-epileptogenesis: effects of glycosylation Neuroscience course in NC State university 7/27,2006

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

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）

分担研究者 奥 直人 静岡県立大学薬学部・教授

## 研究要旨

糖鎖チップは、グライコミクス研究や糖鎖を認識する分子の網羅的解析を可能とするものである。本研究では糖鎖チップを用い、新たな腫瘍バイオマーカーの探索を試みた。その結果、担がんマウス血清で発現量の低下する数種の糖鎖結合性分子の存在が確認された。今後は詳細な解析により、糖鎖に結合する腫瘍マーカーとなる物質の有無や有効性を検討する。

### A. 研究目的

近年の分子生物学の進展と生物工学機器の開発により、ゲノミクス、プロテオミクス研究が発展し、遺伝子やタンパク質を認識する分子の網羅的解析技術も発展してきた。一方、開発途上にある糖鎖チップは、グライコミクス研究や糖鎖を認識する分子の網羅的解析を可能とするものである。本研究では糖鎖チップを用い、新たなバイオマーカーの探索を試みた。

がんは、日本における死因別死亡率第一位の疾患であり、早期発見による死亡率の低下が期待されている。現在、がんの治療効果の判定や、再発の有無の判断に種々の腫瘍マーカーが使用されており、そのほとんどが患者の血液や体液中に検出されるがん特異的な糖鎖抗原である。腫瘍マーカーを用いたがん診断は、安価でかつ低侵襲性であ

るが、早期がんでは糖鎖抗原発現が上昇しないため、現在臨床で使用されている腫瘍マーカーをがんの早期発見に適応するのは困難である。そこで、本研究では、早期がんにおいて血中に発現するタンパク質やがん細胞膜表面に発現する糖鎖を糖鎖チップにて検出することにより、新規の早期がん診断マーカーを探索し、簡便かつ迅速な早期がん診断マーカー測定系を確立することを目的として実験を行った。

### B. 研究方法と結果

まず、担がんマウスを数種類作成し、血清を回収後、血中タンパク質の大部分を占めるアルブミンおよびIgG除去を行った。これらの血清を多種多様な糖鎖が固定化された糖鎖チップに供し、表面プラズモン共鳴（SPR: surface plasmon resonance）イメージング装置

のセンサーチップとして使用することにより、担がんマウス血清中タンパク質-糖鎖間相互作用の網羅的解析を試みた。その結果、担がんマウス血清において結合活性が特異的に変動するタンパク質は検出されなかった。また、血清中には糖鎖抗原に対する IgG が産生されている可能性もあることから、アルブミンのみを除去した血清をがん関連糖鎖抗原である T 抗原 (Gal ( $\beta$  1-3) GalNAc ( $\alpha$  1-6) Glc)、Tn 抗原 (GalNAc ( $\alpha$  1-6) Glc) をそれぞれ固相化した糖鎖チップに供することにより、がん関連糖鎖抗原に対する血中タンパク相互作用の解析を行った。しかし、T 抗原、Tn 抗原に対する親和性が高いタンパク質は確認できなかった。これらの結果より、がん関連糖鎖抗原に対して親和性の高いタンパク質が血清中には大量には存在していない、あるいは親和性が低いため SPR 装置による検出が困難であった可能性が考えられる。そこで、血清からのアルブミン除去過程において限外ろ過も併せて行い、血清中の微量タンパク質の含量を増やすことにより、糖鎖結合活性を示すタンパク質の検出化を試みた。その結果、担がんマウス血清では、Glc ( $\beta$  1-3) Glc ( $\beta$  1-3)Glc、Glc ( $\beta$  1-4) Glc、Gal ( $\beta$  1-3) GalNAc ( $\alpha$  1-6) Glc、Gal ( $\beta$  1-4)[Fc ( $\alpha$  1-3)]GlcNAc ( $\beta$  1-3) Gal ( $\beta$  1-4)Glc、Man ( $\alpha$  1-2) Man の 5 種類の糖鎖に対して結合活性が低下しているタンパク質が存在することが確認された。

### C. 考察

以上の結果より、糖鎖チップを用いることにより、がん罹患時において発現レベルに変動のある生体内物質と糖鎖間の相互作用を検出することが可能であることが示唆された。現在、糖鎖ライブラリーの種類は限られており、今回の検討ではがん罹患時における血清タンパク質の検出化に成功するにとどまったが、今後、新規ライブラリーの構築が進むに従い、がん早期における糖鎖および関連分子が解明され、臨床への応用可能なマーカーが開発されることが期待される。

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

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

分担研究者 有馬直道 鹿児島大学大学院医歯学総合研究科・教授

## 研究要旨

成人 T 細胞白血病(ATL)細胞膜に発現する糖鎖を認識する抗体を作製し、新規診断治療法の開発を行う事を目的とし、ATL 細胞である S1TF をマウスに免疫してハイブリドーマを作製した。ハイブリドーマ培養上清を用いて、糖鎖チップによる SPR 法で糖鎖結合活性をもつ抗体をスクリーニングし、その中から A-14, A-20 を得た。今後、これらハイブリドーマを精製し抗原の特定を進めて行く。

### A. 研究目的

成人 T 細胞白血病（ATL）は鹿児島を中心にして、宮崎、長崎に多発している白血病であり、日本全体では年間に1000人が死亡する極めて治療困難な白血病／リンパ腫である。本疾患は、レトロウイルス HTLV-1 に感染した T リンパ球の腫瘍であるが、ウイルス感染は母乳中の感染リンパ球を介して、主に幼児期に成立する。全ての感染者が ATL を発症するわけではなく、感染者の50人にひとり、すなわち約2%が生涯発症率といわれている。一旦、発症すると従来の抗がん剤による治療には極めて抵抗性であり、現在もっとも優れているというわれる LSG プロトコールでも5年生存率は約17%と極めて低い状況である。従って、現在、いわゆる抗がん剤ではない、それ以外の作用機序による治療薬の開発

が急務と成っている。一方、近年の白血病／リンパ腫における治療の進歩は著しいものがあり、そのなかで、悪性リンパ腫 B 細胞型に対して、細胞膜抗原である CD20 を標的とした抗体療法（リツキシマブ）は従来の治療と併用することで、治療成績を著しく向上させた。この成功により、他の造血器腫瘍でも抗体療法の開発がおこなわれるようになった。

本研究では、ATL 細胞に特異的に発現するであろう糖鎖に対する抗体を開発し、新しい診断治療法の開発を目指すものである。

### B 研究方法

ATL 患者白血病細胞由来の細胞株 S1TF を Balb/c マウスに免疫、ブースター後に脾臓細胞とマウスミエローマ細胞株である sp2/0 細胞を PEG 法に

より細胞融合を行わせ、常法によりハイブリドーマを得た。増殖して来た細胞をクローン化し、SITF と染色するクローンを 48 株選択した。

各培養上清を隅田らが開発した表面プラズモン共鳴法 (SPR 法) による糖鎖チップを用いて糖鎖結合能を検討した。今回の糖鎖チップでは同時に 37 種類の糖鎖結合物質の活性が検出可能である。なお培養上清中のマウス抗体はを用いてアイソタイプを検討した。

#### C 研究結果

ハイブリドーマ、No14 と 20 に、何らかの糖鎖結合活性が検出された。そのなかで特に、No14 上清は、硫酸化オリゴ糖および GalNAc( $\alpha$ 1-6)*Glc*, Man( $\alpha$ 1-2)*Man*, Man( $\alpha$ 1-3)Man( $\alpha$ 1-6)*Man*, *Glc*( $\beta$ 1-3)*Glc*( $\beta$ 1-3)*Glc* に結合活性を示した。また No20 は硫酸化オリゴ糖に結合活性を示した。特に No14 と GalNAc や Mannose 糖との結合の強さは、コントロールとして用いた mouse IgG の 4.0mM という高濃度と比べても際立った結合を示していた。

各培養上清中の抗体アイソタイプは、No14 は IgA, kappa であり、No20 は IgM, kappa であった。

#### D 研究考察

今回の検討では、34 種類のハイブリドーマ培養上清の糖鎖結合活性を SPR 法を用いた。本方法は多種類の糖鎖に対する結合活性を簡便に見る点ですぐれている。両ハイブリドーマ上清とも硫酸化糖と結合した。ただし硫酸

化糖については非特異的な結合の可能性も否定できず、デキストラン添加による阻害実験をしないと確認ができない。他方、No14 における GalNAc 糖や Mannose 糖との結合については特異的な結合である可能性ありと思われる。とはいえ、今回の実験での問題点はもちいた抗体が培養上清であるということであり、硫酸化糖以外の糖鎖に結合したサンプルでも完全には非特異的な結合を否定できていない。この問題を解決する目的で、培養上清からアフィニティカラムでの精製を試みている。現在まで、IgA は KAPTIV-AE カラム (ファルマシア) で、IgM は KAPTIV-M カラム (ファルマシア) を用いて精製を試みているが、SDS-PAGE で分析する限り、それほど純化に成功していない。今後は、無血清培地などを用いて抗体の産生と精製をおこなう予定である。

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

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

概要

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。この装置は生体分子のアフィニティ測定を簡易に行うことを目的とする。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 は大掛かりな光学系と高価な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。

ファイバ型 LPR 測定装置の構成を図 1 に示した。光源として LED、検出器としてフォトダイオードを用い、光源から光ファイバに入射した光がファイバカプラを通してセンサ部に到達し、金微粒子に光が照射される。金微粒子により散乱された光は再びファイバからファイバカプラを通り、光検出器によりその強度が測定される。センサファイバ先端には

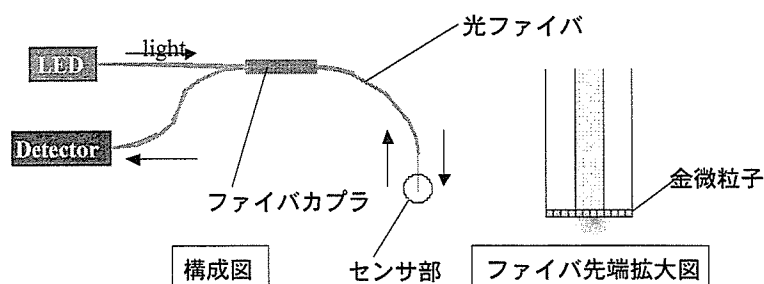


図 1 LPR センサの概略図



粒径 40nm の金ナノ粒子が固定化され、この粒子に糖鎖リガンドを修飾することによってシュガーチップセンサファイバを作製する。

## 目的

昨年度は 1ch の LPR 測定装置を開発し、抗原抗体反応などの測定による評価を行ってきたが、本年度は 8ch 同時測定が可能な LPR 装置の製作と性能の改善、安定性評価などを目的として開発を進めた。8ch 装置開発の報告及び、安定性評価として金ナノ粒子散乱光の分光測定、装置の再現性評価、最後にシュガーチップによるレクチンの測定結果について報告する。

## 結果・考察

### 8ch 装置の作製

昨年度作製した 1chLPR 装置においては、LED からの光をコリメートレンズを用いて光ファイバにカップリングしていた。今年度はよりカップリング効率が高く、かつ低コスト化が可能な方式を開発した。すなわち、従来用いていた砲弾型 LED の代わりに、フラットモールドの LED を採用し、それに直接光ファイバをカップリングした。発光面から光ファイバへの距離を最短にすることによって、従来の方式では  $0.9 \mu\text{W}/\text{cm}^2$  であった入射光が新方式では  $3 \mu\text{W}/\text{cm}^2$  以上と 3 倍以上のカップリング効率を達成した。

今年度作製した 8chLPR 装置は、光源—カプラー—検出器のセットを 8 基内蔵し、専用開発した 24bitAD コンバータにより PC にシグナルを取り込む構成をとった (図 2)。装置と PC との通信は RS232c により行われる。また光ファイバは従来用いていたメカニカル光スプライサから光通信用に用いられる MPO コネクタを特殊加工したコネクタを採用し、コネクタ部での反射によるオフセットの低減と、センサファイバの脱着によるシグナルの変化を測定に支障のないレベルに抑えることに成功した。

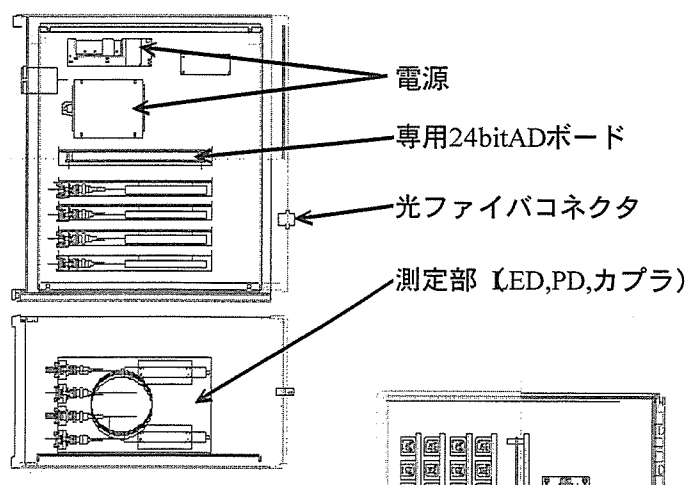


図 2 8chLPR 装置構成

### 安定性・再現性の評価

金ナノ粒子の乾燥時の安定性については昨年度から検討を進めてきたが、本年度は分光測定により、タンパクの吸着や乾燥により引き起こされる現象について検討を行った。光源としてモリテックス製ハロゲンランプ（150W）、分光器としてオーシャンオプティクス社製の HR2000 を用いて測定を行った結果の一例を図 3 に示した。図 3 のスペクトルはそれぞれ、a)金ナノ粒子固定化後、b)金ナノ粒子に BSA を吸着させた後、c)そのファイバを乾燥させた後のスペクトルを示している。BSA が金ナノ粒子に吸着すると、全体に散乱光が増加するが、乾燥すると長波長側の散乱光が大幅に増加していることが分かる。この大きな変化は金ナノ粒子同士が近づいた際に見られるため、つまり金ナノ粒子が凝集していることを示している。以上の結果より、金ナノ粒子の凝集によってシグナルが変化すると、生体分子の測定の再現性に悪影響を及ぼすことが推察される。

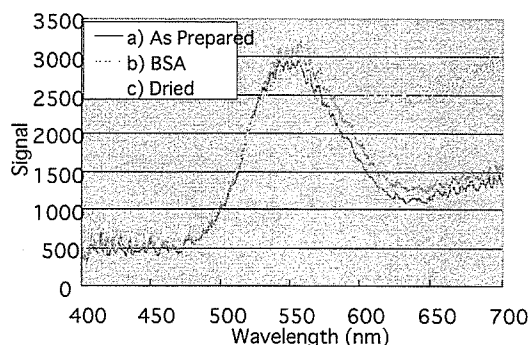


図 3 金ナノ粒子の分光測定結果

センサファイバの安定性・再現性評価を行うため、同時に作製したセンサファイバから得られるシグナルのバラつき評価を行った。11本の光ファイバを用意し、シランカップリングによるアミノ基修飾を行った。アミノ基修飾した光ファイバに対して Au コロイドの修飾・水洗後、光ファイバを乾燥させ、センサファイバとした。そのファイバを用いて、純水を測定したときのシグナル量 (mV)、ショ糖 10% 溶液を測定したときのシグナル変化量 (mV) 及び変化率 (%) を測定しその値の CV 値を算出した。その結果、純水でのシグナル量で CV 値が 23.7%、ショ糖溶液を測定したときのシグナル変化率の CV 値が 25.5% であった。さらに再度乾燥させると CV 値はさらに増加しそれぞれ 24.8%、31.8% となった。この結果よりセンサファイバ作製における乾燥は、測定結果のバラつきに無視できない影響を与えることが示された。

8chLPR 装置のコネクタとして用いる MPO コネクタの評価を行った結果、コネクタの脱着によるシグナル変化の CV 値は 0.5~2.8% と非常に小さく、測定に支障ないことが確認された。また、コネクタ部での反射によるオフセットノイズも通常のシグナルの 1% 以下で

安定しており、本装置のコネクタとして問題なく使用できることが分かった。

#### シュガーチップによる測定結果

隅田研究室において金ナノ粒子に糖鎖リガンドを修飾し、レクチンの検出を行った結果を図 4 に示す。糖鎖リガンドとしては mono-Lac (図 4 a))、検出対象のレクチンは RCA120 である。測定は 1ch 装置を用いて測定し、金ナノ粒子はチオクト酸修飾ファイバ上に固定されている。結果は規格化して示した。RCA120 の濃度と相関のあるシグナルが得られていることが分かる。SPR と検出可能レベルは同程度であるといえるが、SPR で得られる結果と比べると S/N が劣っており、同等の性能を示すためには安定性の改善及び S/N の改善が必要である。

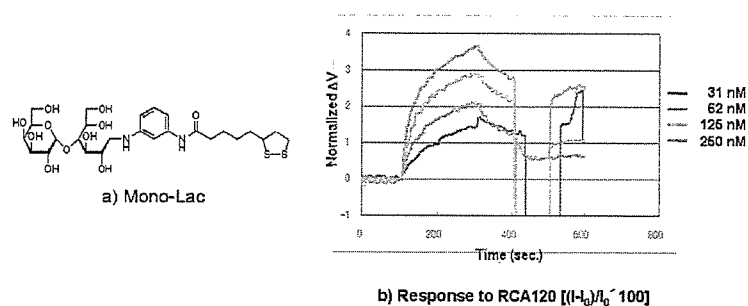


図 4 シュガーチップセンサファイバによる RCA120 の検出結果

#### まとめ

昨年度作製した 1chLPR をベースに、光源・検出器等の装置構成に更なる改善を加えた 8chLPR 装置を作製した。課題となっていた光ファイバの接続方式についてもほぼ解決されたと考えられる。安定性・再現性評価の結果、装置・コネクタについては金ナノ粒子の乾燥の影響が大きいことが分かった。シュガーチップによる測定は SPR に近いレベルまで可能であることが分かったが、同等の結果を得るには安定性・再現性・S/N に更なる改善が必要となる。また今後はセンサファイバの安定した製造方法が大きな課題として挙げられる。

#### 知的所有権の出願・登録状況等

特になし。

研 究 成 果 の 刊 行 に 関 す る 一 覧 表