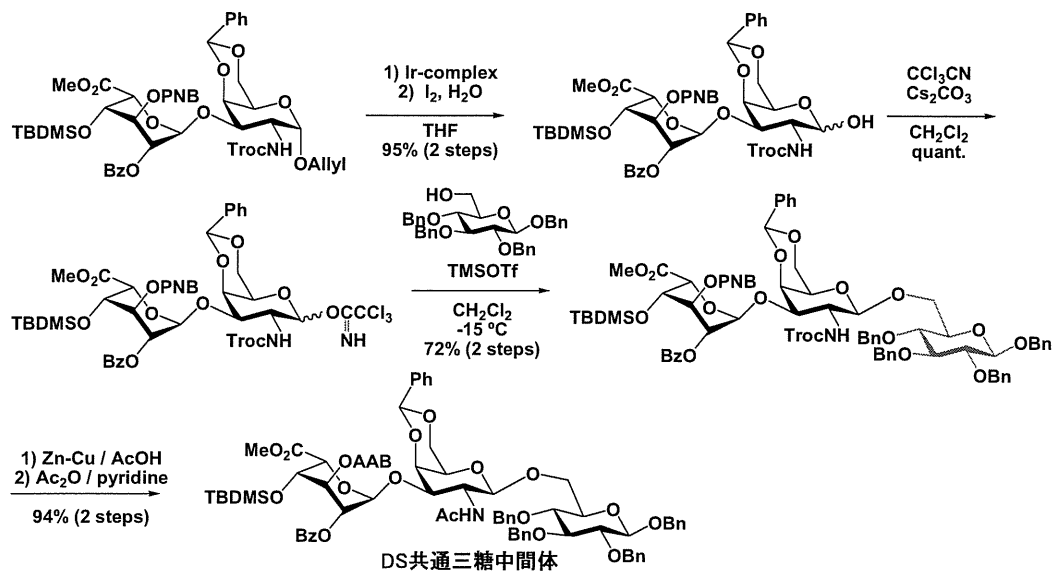
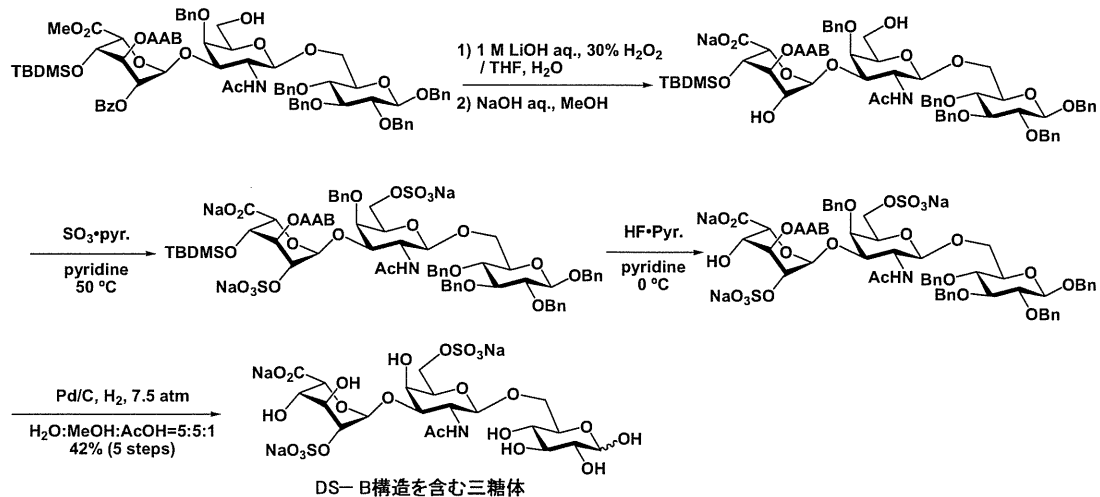


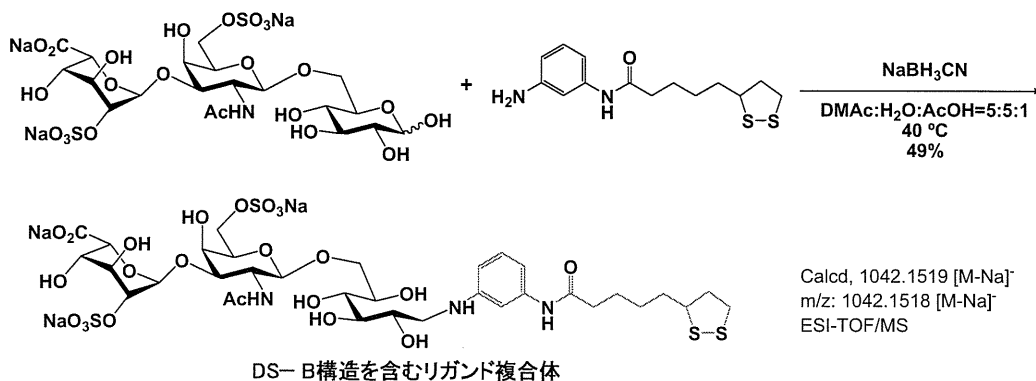
- 長岡市 発表日 7月12日 (ポスターP-153, 予稿集 p.149)
- ◆ 杜若祐平, 市来幸子, 若尾雅広, 隅田泰生
デルマタン硫酸-E 二糖部分構造に関する
合成研究
第30回日本糖質学会年会, 平成23年7
月11-13日 長岡リリックホール, ハイ
ブ長岡, 新潟県長岡市 発表日 7月13日
(ポスターP-156, 予稿集 p.150)
 - ◆ 若尾雅広, 斎藤彰寛, 春山まみ, 大石紘,
松山奈央, 出口弘史, 馬渡彩, 隅田泰生
ヘパラン硫酸部分構造ライブラリーの構
築に向けた二糖ビルディングブロックの
合成研究 第30回日本糖質学会年会,
平成23年7月11-13日 長岡リリックホ
ール, ハイブ長岡, 新潟県長岡市 発表日
7月13日 (口頭 B4-01, 予稿集 p.56)
 - ◆ 隅田泰生 「糖鎖とナノバイオテクノロジー
に基づくウイルス高感度検出法の開発
(Development of high sensitive diagnostic
method of viruses based on
nano-glycobiotechnology)」
第30回日本糖質学会年会, シンポジウム
2: 糖鎖機能解明のブレークスルーを求め
て 平成23年7月11-13日, 長岡リリッ
クホール, ハイブ長岡, 新潟県長岡市
発表日 7月13日 (招待講演)
 - ◆ 隅田泰生
糖を使ったナノテクでウイルスを測る
4/17 Science Cafe in Ooita 特別版, 平成
23年4月17日 大分文化会館 2F 502 会
議室, 大分県大分市 招待講演,
- 独立行政法人 科学技術振興機構 JST
イノベーションサテライト宮崎 主催
- ◆ Xu Zang, Sachiko Nakamura Tsuruta, Mami
Haruyama, Risa Yokoyama, Mami
Nagatomo, Masahiro Wakao, Kazuhiro
Nakajima, Kazue Aoyama, Toshiomi
Okuno, Saeko Morikawa, Satoshi Hiroi,
Tetso Kase, Hirohisa Nose, Junichi Nishi,
Mika Okamoto, Masanori Baba, Yasuo Suda
Super high sensitive detection of viruses using
sugar-chain immobilized gold
nanoparticles(SGNPs)
ACS National Meeting & Expo, San Diego
Spring 2012 アメリカ合衆国 (米国)
知的財産権の出願・登録状況
1. 特許取得
 - ◆ 仮屋博敬, 隅田泰生 「硫酸化糖鎖固定化金
ナノ粒子及びデキストラン硫酸固定化金
ナノ粒子によるウイルスの捕捉方法、分画
方法、免疫方法、抗ウイルス抗体製造方法」、
特願 2012-020849 (2012/2/2)、出願人：
国立大学法人鹿児島大学、株式会社スディ
ックスバイオテック
 - ◆ 隅田泰生、馬場昌範、岡本実佳 HIV-
1 の低侵襲的な簡便かつ高感度検査法」、
台湾出願 101107378 (2012/3/5) 、出願
人：世錡生命科學有限公司



Scheme 1 種々のデルマタン硫酸 (DS) 部分二糖構造を構築するための共通中間体の合成



Scheme 2 Type-B デルマタン硫酸 (DS-B) 部分二糖構造の合成



Scheme 3 Type-B デルマタン硫酸 (DS-B) 部分二糖構造を含むリガンド複合体の合成

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	Glc4Glc	Glc4Glc4 Glc	Glc6Glc	Glc6Glc6 Glc	Glc23Glc6 Glc	Glc54Glc	Glc56Glc	Glc66Glc	Glc4Glc4 Glc	Glc23GlcNAc αβ6Glc	Glc4GlcNAc αβ6Glc	Glc4Glc
B	Glc4(Fuc4) GlcNAc33Glc αβ6Glc	Man2Me	Man3Mann6 Me	Man6Me	Fuc2Glc24 Glc	Fuc6Glc	Fuc66Glc	Xyβ6Glc	GlcNAc6Glc α	GlcNAc24Glc αNAc	GlcNAc56Glc α	GlcNAc33Glc αβ4GlcNAc β3Glc4Glc
C	GlcNAc6Glc α	GlcNAc33Glc α	NeuAcα23 Glc4Glc	NeuAcα23 Glc24GlcNAc αβ6Glc	NeuAcα23 Glc23GlcNAc αβ6Glc	NeuAcα23 Glc24GlcNAc αβ6Glc	NeuAcα23 Glc4Glc	NeuAcα23 Glc23GlcNAc αβ6Glc	NeuAcα23 Glc4GlcNAc αβ6Glc	NeuAcα23 GlcNAc αβ6Glc	Chondroitin (Chc)	Chondroitin A (OSA)
D	Chondroitin B (CSB)	Chondroitin C (CSC)	Chondroitin D (CSD)	Chondroitin E (CSE)	GlcNAc6Glc αβ6Glc	GlcNAc25Glc αβ6Glc	GlcNAc4Glc αβ6Glc	GlcNAc6Glc αβ6Glc	GlcNAc3Glc NAc4Glc24Glc Glc	Heparin (Hep)	DS25 Dextran Sulfate	CM-chitin CarboxyMe thyl

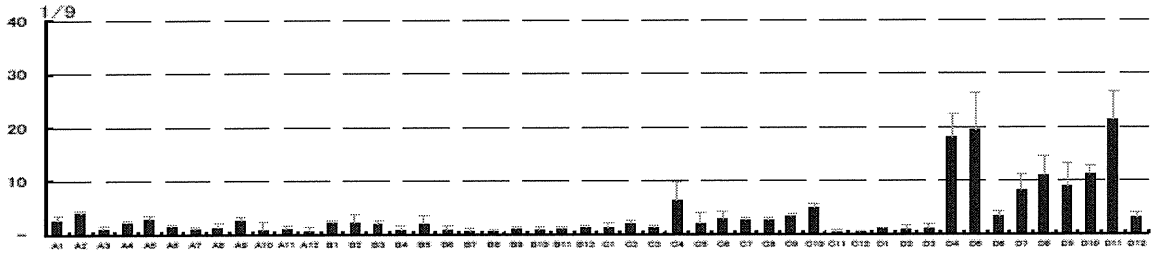


図1 PLC/PRF/5細胞で培養した上清中のHBV抗原タンパク質(HBs抗原)の糖鎖結合能(アレイ型のチップには上段の48種類の糖鎖を固定化)

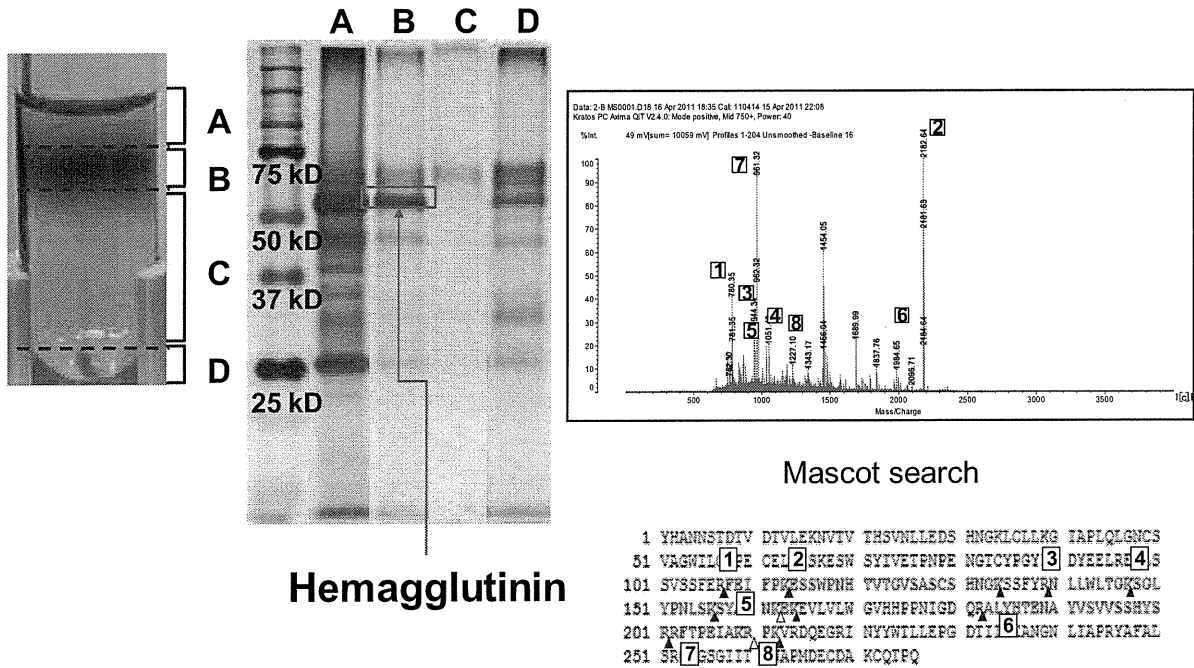


図2 DS25-GNPによるインフルエンザウイルス表面抗原の分画と同定
 左：シヨ糖密度勾配超遠心によるDS25-GNPが結合したウイルス表面抗原の分画
 中央：分画成分のSDS-PAGE
 右：ゲル内タンパク質のトリプシン分解とペプチドMSフィンガープリント法によるタンパク質の同定

厚生労働科学研究費補助金（医療機器開発推進研究事業）
分担研究報告書

シアル酸含有オリゴ糖鎖の合成に関する研究

研究分担者 石田 秀治 岐阜大学応用生物科学部 教授

研究要旨

生体内に微量存在するガングリオシドとして、代表的な自己免疫性神経疾患の1つであるギランバレー症候群（GBS）患者の血清と反応することが知られている GalNAc-GD1a に着目し、その全合成を達成した。今後、得られた合成標品を患者血清との反応に供する予定である。

A. 研究目的

近年、生物情報分子として糖鎖の機能に注目が集まっている。糖鎖は主に動物細胞の表層に存在し、細菌やウイルスに対する受容体としての機能や細胞のマーカーとしての機能を有している。分担者らは糖鎖の構造と機能を分子レベルで解明するために、糖鎖の化学合成を精力的に進めている。本研究では、自己免疫性神経疾患の1つであるギランバレー症候群（GBS）の患者血清と反応し、診断マーカーとしての応用が期待される GalNAc-GD1a に着目し、その全合成を達成した。今後、生体から単離した標品と比較しながら患者血清との反応性を調べる予定である。

B. 研究方法

標的分子は、7糖が脂質と結合した構造をしており、糖鎖部分の非還元側にGM2エピトープと呼ばれる3糖が繰り返した構造を有している。したがって、中間体としてGM2エピトープ3糖を設計し、それを縮合する事で2量体とした後、ガングリオシド合成において高反応性のビルディングブロックとして汎用されているグルコシルセラミドと縮合して合成を達成することとした。そして、得られる合成標品をギランバレー症候群（GBS）患者血清との反応性をELISA法により調べる事とした。

（倫理面への配慮）

本研究では、患者検体を用いた実験までは行っておらず、動物実験も行っていないため、倫理面の配慮は必要ない。

C. 研究結果

非還元側6糖は、GM2エピトープと呼ばれる3糖が2回繰り返した構造であり、骨格となる3糖は既知の方法で合成した。得られた3糖は、水酸基からアミノ基への保護基の転移を巧みに利用することで、ガラクトースの3位が遊離となった3糖受容体に効率的に導いた。一方、この3糖は6段階で糖供与体であるトリクロロアセトイミデート体に導いた。3糖性の糖供与体と糖受容体を1.0当量ずつついで縮合し、高収率で6糖に導いた。得られた6糖を3段階で供与体に導いた後、ガングリオシド合成において有用性が実証されている環状グルコシルセラミド受容体と縮合し、目的とする7糖性糖脂質を高収率で構築した。最後に全保護基を脱離し、目的とするGalNAc-GD1aの全合成を達成した。

D・E. 考察・結論

GM2エピトープ3糖を合成中間体に用いることで効率的に6糖を合成し、それを高反応性のグルコシルセラミドと縮合することで、目的とする

GalNAc-GD1aの全合成に成功した。今後、合成標品をGBS血清患者と反応させ、生体由来の天然品と同等の反応性を比較検討し、合成GalNAc-GD1aが、今後、GBS診断キットの開発に応用できる可能性を追求する。

F. 研究発表

1. 論文発表

- ◆ Shimizu, H., Iwayama, Y., Imamura, A., Ando, H., Ishida, H. and Kiso, M.: Synthesis of the disialic acid-embedded glycan part of ganglioside HPG-1. *Biosci. Biotech. Biochem.*, 75(10), 2079-2082, 2011.
- ◆ Iwayama, Y., Ando, H., Tanaka, H., Ishida, H. and Kiso, M.: Synthesis of the glycan moiety of ganglioside HPG-7 with an unusual trimer of sialic acid as the inner sugar residue. *Chem. Comm.*, 47, 9726-9728, 2011.
- ◆ Fujikawa, K., Nakashima, S., Konishi, M., Fuse, T., Komura, N., Ando, T., Ando, H., Yuki, N., Ishida, H. and Kiso, M. The first total synthesis of ganglioside GalNAc-GD1a, a target molecule for autoantibodies in Guillain-Barré syndrome. *Chem. Eur. J.* 17, 5461-5651, 2011.
- ◆ Tamai, H., Ando, H., Tanaka, H., Hosoda-Yabe, R., Yabe, T., Ishida, H. and Kiso, M.: The total synthesis of the neurogenic ganglioside LLG-3 isolated from the starfish *Linckia laevigata*. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.*, 50, 2330-2333, 2011.
- ◆ Nakashima, S., Ando, H., Imamura, A., Yuki, N., Ishida, H. and Kiso, M.: A first total synthesis of a hybrid-type ganglioside associated with amyotrophic lateral sclerosis-like disorder. *Chem. Eur. J.*, 17, 588-597, 2011.

2. 学会発表

- ◆ 石田秀治, 今村彰宏, 安藤弘宗, 結城伸泰, 山口芳樹, 木曾真: 糖鎖の精密合成と自己免疫疾患. 第30回日本糖質学会年会 シンポジウム2: 糖鎖機能解明のブレークスルーを求めて、長岡リリックホールパイプ長岡(新潟), 平成23年7月11日~13日(招待講演).
- ◆ Ishida, H.: First total synthesis of lipooligosaccharide (LOS) of *Campylobacter jejuni*. Claude S. Hudson Award Symposium in Carbohydrate Chemistry Symposium in honor of Professor Richard Schmidt at ACS National Meeting, Anaheim CA, USA., March 27-31, 2011 (Invited lecture).
- ◆ 岩山祐己, 安藤弘宗, 石田秀治, 木曾真: トラフナマコ由来生理活性ガングリオシドHPG-7の全合成研究, B1-02, 第30回日本糖質学会, 長岡リリックホールとハイブ長岡(新潟), 平成23年7月11日~13日(Oral).
- ◆ 小西美紅, 藤川紘樹, 中島慎也, 河村奈緒子, 安藤弘宗, 石田秀治, 木曾真: 新規環状グルコシルセラミド受容体を用いたガングリオシドGalNAc-GM1bの全合成研究, 2A37p05, 2011年度大会 日本農芸化学会、京都、平成23年3月25日-28日(Oral).
- ◆ 山本直輝, 田中秀則, 安藤弘宗, 石田秀治, 木曾真: 分子イメージングへ向けたシアリルルイスXプローブの合成研究, 3A37a15, 2011年度大会 日本農芸化学会、京都、平成23年3月25日-28日(Oral).
- ◆ 水野孝星, 玉井秀樹, 安藤弘宗, 石田秀治, 木曾真: 棘皮動物由来ガングリオシドCJP-2の合成研究, 2A37p04, 2011年度大会 日本農芸化学会、京都、平成23年3月25日-28日(Oral).
- ◆ 小西美紅, 藤川紘樹, 中島慎也, 河村奈緒子, 安藤弘宗, 石田秀治, 木曾真: 新規環状グルコシルセラミド受容体を用いたガングリオシドGalNAc-GM1bの全合成. 第9回糖鎖科学名古屋

拠点「若手の力」フォーラム、河合塾岐阜校71
教室、平成23年10月22日 (Poster)

なし

- ◆ 中島慎也, 安藤弘宗, 今村彰宏, 石田秀治, 結城伸泰, 木曾真: ALS様疾患に関連するハイブリッド型ガングリオシドの効率的全合成研究. 第9回糖鎖科学名古屋拠点「若手の力」フォーラム、河合塾岐阜校71教室、平成23年10月22日 (Poster)
- ◆ 中島慎也, 安藤弘宗, 今村彰宏, 結城伸泰, 石田秀治, 木曾真: An efficient total synthesis of hybrid-type ganglioside associated with amyotrophic lateral sclerosis-like disorder. 第31回内藤コンファレンス、シャトレーゼ ガトーキングダム サッポロ (北海道)、平成23年9月13-16日 (poster)
- ◆ 小西美紅, 藤川紘樹, 中島慎也, 河村奈緒子, 安藤弘宗, 石田秀治, 木曾真: 環状グルコシルセラミド受容体を用いたガングリオシド GalNAc-GM1bの全合成, P-128, 第30回日本糖質学会, 長岡リリックホールとハイブ長岡 (新潟), 平成23年7月11日~13日 (poster).
- ◆ Konishi, M., Fujikawa, K., Ando, H., Ishida, H., Kiso, M.: The first total synthesis of ganglioside GalNAc-GM1b using a novel cyclic Glc-Cer acceptor. 16th European Carbohydrate Symposium. July 3-7, 2011, Sorrento-Naples, Italy (poster)

G. 知的財産権の出願・登録情報

(予定を含む。)

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

厚生労働科学研究費補助金（医療機器開発推進研究事業）
「シュガーチップ糖鎖固定化金ナノ微粒子を用いた
ウイルス性疾患の超早期検査・診断法の開発」
平成 23 年度 分担研究報告書

表面プラズモンバイオセンサの高感度化と高集積化に関する研究に関する研究

研究分担者 梶川浩太郎 東京工業大学 大学院総合理工学研究科・教授

研究要旨

非標識でウイルスや蛋白質などのセンシングが可能な局在表面プラズモン共鳴を用いた検出装置（表面プラズモンバイオセンサ）の高感度化のため、コアシェル構造の金ナノ粒子の検討を行った。従来から用いられている金だけからなるナノ粒子に比べて1桁程度の高感度化に成功した。また、昨年開発した金の異常反射を用いた高密度蛋白質チップの作成と検出システムを使って、DNAや蛋白質のマルチチャンネルバイオセンシングに成功した。これらの手法はウイルス検出にも適用が可能であり、簡便で網羅的な検出手法として期待される。

A. 研究目的

ウイルスや蛋白質などのセンシングにおいて、検出対象分子を蛍光物質などで標識する必要が無い表面プラズモン共鳴（surface plasmon resonance: SPR）や局在プラズモン共鳴(localized surface plasmon resonance: LPR)は有力な手段である。しかし、実際の医療現場で実用化されるためには、1〜2桁程度の感度の改善が必要である。昨年度は、金ナノ粒子を使ったLPRを改良し、金ナノ粒子の2量体構造を使ってこれを解決した。研究の結果、アビジン蛋白質検出限界を1/10〜1/100とすることに成功した。しかし、2量体構造を安定に形成することが難しいため、データのばらつきが多いという問題があった。本年度は、これを解決するため、2量体構造と同様のセンシング性能を持つコアシェル構造について、理論計算および実験の両面から検討を行

い、屈折率感度を約1桁向上することに成功した。屈折率感度とは、周辺媒質の単位屈折変化（屈折率変化1に対する）に対する吸収波長変化のことであり、単位はnm/RIである。大きい値ほど感度は高く、これまで用いられてきた金のみからなる球状のナノ粒子では、50-75nm/RIである。本研究では、コアシェル構造を用いて数百nm/RIを持つ金属ナノ構造を作製することを目標とした。

また、このコアシェル構造の表面に金ナノ粒子を固定化することにより、さらに高い感度を実現できることもわかった。局在プラズモンバイオセンサでは、検出対象物質（アナライト）が金ナノ粒子などに結合することにより生じる周辺の屈折率変化を検出している。そのため、周辺媒質の屈折率変化に対してセンシティブな金ナノ構造を用いれば、局在表面プラズモンを使ったバイオセンサを高感度

化することができる。

一方、昨年度では多種の検出対象物質を一度に検出できる方法として高密度蛋白質チップの作成と検出を行った。チャンネル密度は1平方ミリメートルあたり100ch と高い密度の蛋白質チップの作成とその検出システムである。個々のチャンネルの直径は 60 μm であり、これを 100 μm の間隔で10 \times 10個配置したチップの作製が可能である。これは、これまで報告されている蛋白質の非標識バイオチップの中で最も高密度なマルチチャンネルバイオセンシングシステムである。検出には異常反射という表面プラズモン共鳴に類似する光学効果を用いて、物質の有無を画像化する方法を採用している。この方法は簡便で比較的感度が高いという利点がある。本年度はこれを利用して直径65 μm のセンシングドットを用いたマルチチャンネルバイオセンシングに成功

した。試料は2種類で、蛋白質およびDNAについてマルチチャンネルバイオセンシングを行なった。この手法は、蛋白質やDNAだけでなく、ウイルスの検出にも利用することが可能である。

B. 研究方法

a. コアシェルによる高感度化

図1に今回研究を行ったコアシェル構造の作製プロセスを示す。直径 200nm のポリスチレン粒子をガラス基板上に単層となるように堆積し、そこへ金薄膜を質量膜厚 20nm、または 30nm となるように真空蒸着を行った。ポリスチレン粒子の固定化には S-320 というシランカップリング剤を用いた。この作製手法では、コアのポリスチレン粒子全体を金薄膜のシェルが覆うことはなく、ハーフコアシェル構造となっていると考えられる。この構造を持つ試料を試料A (t)と呼ぶことに

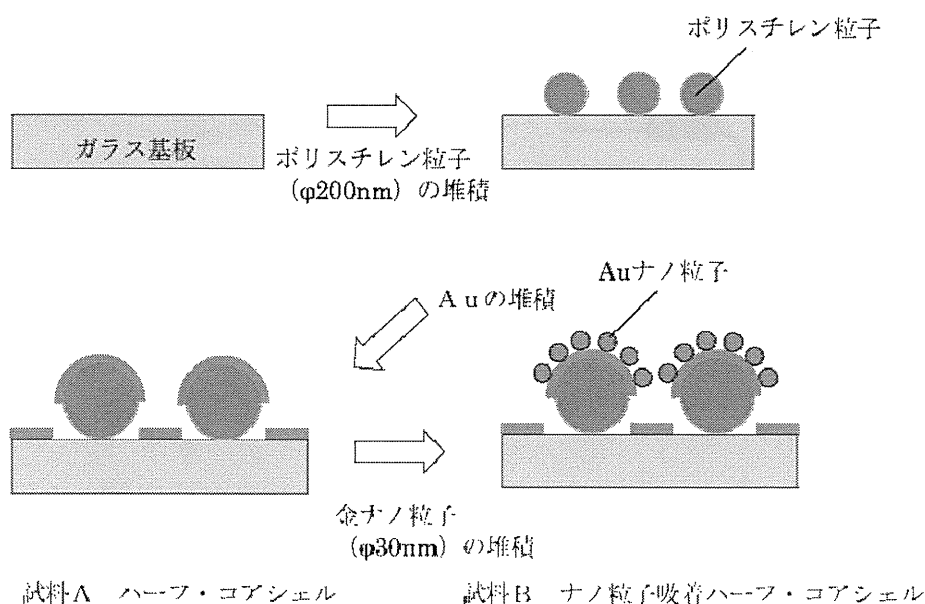


図1 試料の構造と作製方法

する。括弧内の数字 t はシェルの質量膜厚 (nm 単位) である。続いて、試料Aの表面に直径 30nm の金ナノ粒子を固定化した試料B (t) も作製した。金ナノ粒子の固定化にはアミノウンデカンチオール の自己組織化単分子膜を用いた。この構造は、金ナノ粒子が固定化されたハーフコアシェル構造と考えられる。

以上の試料を空气中 (屈折率 $n=1$)、あるいは、水 ($n=1.33$)、エタノール ($n=1.36$)、などに浸漬し、透過吸収スペクトルを測定することにより、LPR の共鳴ピークを調べて、屈折率感度を算出した。尚、吸収スペクトル測定時のベースラインには同じ厚さの金を蒸着したガラス基板を用いた。

b. マルチチャンネルバイオセンシング

昨年度作製したマルチチャンネルバイオセンシングシステムを利用して、実際

にタンパク質やDNAのセンシングを行った。図2 (a)に示す自作のスポット装置を利用して、リガンドを直径 $65\mu\text{m}$ 程度の大きさにスポットして、センシングドットとすることができる。スポットのピンにはPDMS (Polydimethylsiloxane) を先端に塗布した光ファイバを用いる。光ファイバからの戻り光を検出することにより、ピンと基板の間の距離を測定し、PCによりその位置やピンの高さを自動制御することができる。

作製したバイオチップを試料溶液に浸漬して、乾燥後、我々が開発した図2 (b)に示す読み取り装置を利用してアナライトの検出を行う。波長 470nm の光を用いた場合には、分子が塗布されている部分は、その量に応じて異常反射により反射率が低下するので、その吸着や結合量を検出できる。

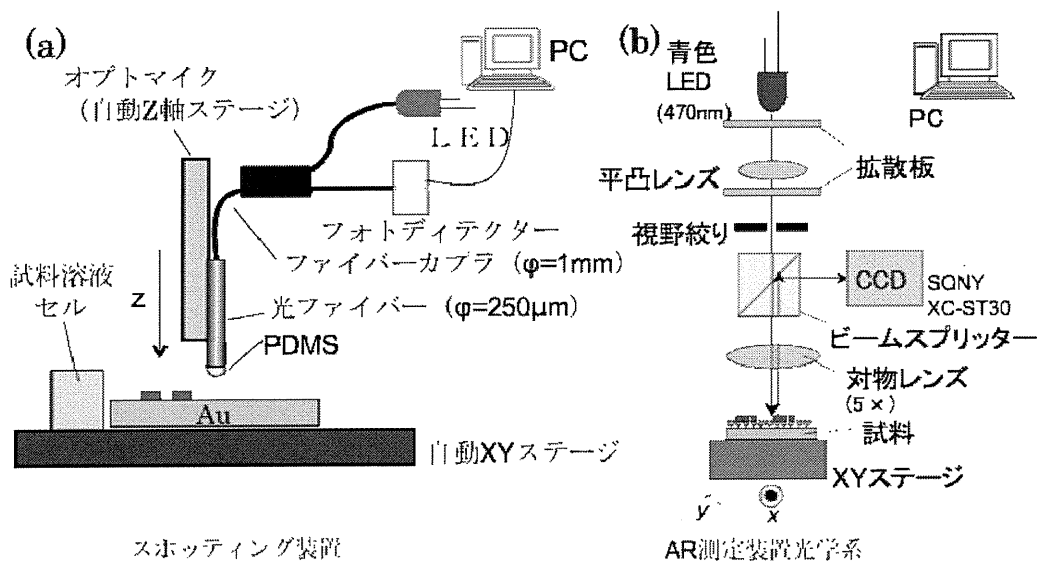


図2 異常反射 (AR) を利用したバイオチップの測定システム (a)スポットティングのための装置の概略 PDMSに試料溶液を吸着させ、スポットを行う。(b)異常反射を使ったマルチチャンネルバイオセンシング像の測定装置。

リガンドには、アビジンの検出には抗アビジン抗体およびBSAを固定化したものを用いた。アビジンはアビジン抗体に特異的に結合し、BSAへは特異的な結合はない。そのため、アビジンが試料中に存在する場合には、抗アビジンドットのみへの結合を検出することができる。

また、末端にチオール基を有するDNAを金表面上に固定化して、相補的な配列を有するDNA(17塩基対)および相補的な配列を有しないDNAを試料として用い、同様にセンシング特性を調べた。

(倫理面への配慮)

今回の研究内容には倫理面への配慮が必要な項目はない。

C. 研究結果

a. コアシェルによる高感度化

図3(a)に様々な屈折率 n_0 を持つ周辺媒質における試料A(30)の吸収スペクトルを示す。 $n_0=1.0$ の場合には、吸収ピークは785nm付近であり、球状のコアシェル構造ではない金粒子の場合における吸収ピーク510nmから大きくレッドシフトしている。 $n_0=1.33$ 、1.36の場合には830nm、835nmに吸収ピークを持つ。周辺媒質の屈折率によりそのピークが大きく変化していることがわかる。さらに試料B(30)では、図3(b)に示すように $n_0=1.0$ の吸収ピークは760nm付近であるが、これが $n_0=1.33$ 、1.36、1.37の場合には845-855nm付近に大きくシフトしており、追加の金ナノ粒子の効果が現れている。

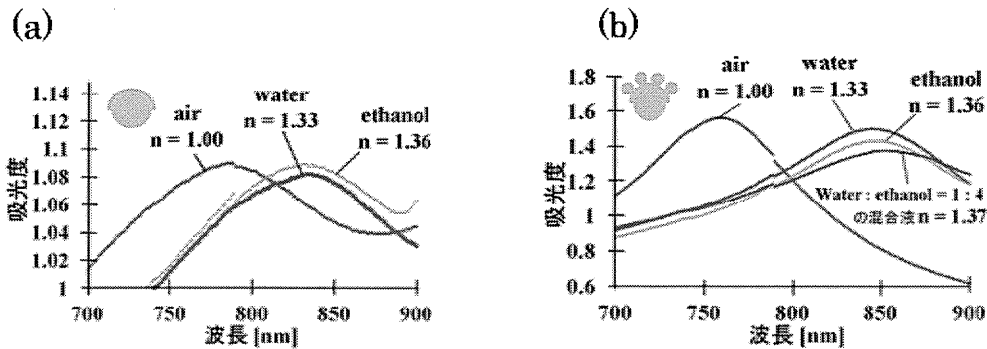


図3 (a)試料 A(30)および(b)試料 B(30)の吸収スペクトル

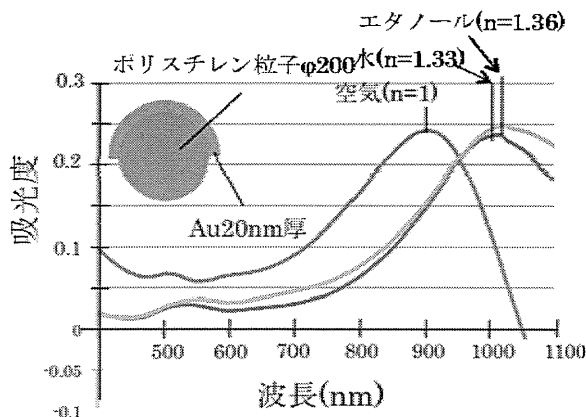


図4 試料 A(20)の吸収スペクトル

次に図4に試料A(20)の吸収スペクトルを示す。900nm付近にあるピークが水やエタノール浸漬時には1110nm付近に大きくシフトしていることがわかる。試料B(20)では、空気中のピーク位置は940nm付近であった。水やエタノールに浸漬した際のピーク位置のシフト量が大きく、現有設備の分光器では測定できなかった。

b. マルチチャンネルバイオセンシング

図5(a)に抗アビジン抗体およびBSAをスポットした時の異常反射像を示す。A1, B1の位置にはコントロールとして水をスポットしている。抗アビジン抗体は、B2,A3,B4の位置にスポットされ、BSAはA2,B3,A4の位置にスポットされている。これらの位置では、反射率が低下しており、アナライトが金の基板に結合していることが確認できる。次に、アビジンを含む溶液に浸漬した場合の異常反射の顕微鏡イメージを図5(b)に示す。この像では変化がわかりにくいので、点線で示すよ

うにA2からA4の方向に沿って、反射率の位置依存性をプロットしたものを図5(c)に示した。A3の位置で反射率が6%程度変化しているのに対して、A2およびA4での変化量は非特異結合によるものと考えられ2.5%程度と小さい。図6に図5(b)の像の反射率強度を図5(a)の反射率強度で割った差分イメージを図6に示す。

割り算は対応する各ピクセルにわたって行った。この処理では明るい部分では、反射率大きく低下したことを示している。この処理の結果、アビジンが結合したドットがはっきりと明るく示されており、このチップによりアビジンの検出がおこなわれたことがわかる。

次に、DNAをリガンドとして、相補的なDNAを検出した実験結果を図7に示す。アナライトに対して相補的なDNAがスポットされているのはA2,B3,A4の位置である。図7(b)に示すように、DNAが結合したスポットの反射率が大きく低下していることがわかる。

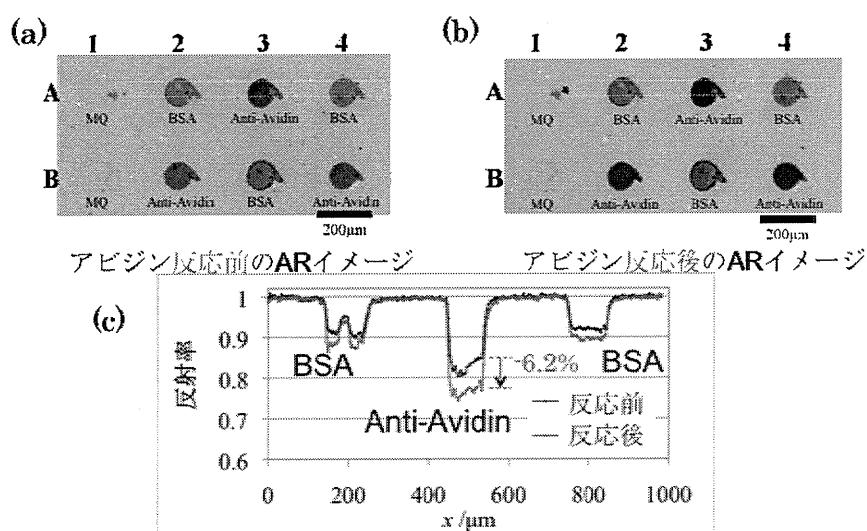


図5 (a)リガンドが塗布されたチップ、(b)反応後のチップ (c) 行Aの反射率をプロットしたものの。黒線が反応前、赤線が反応後。

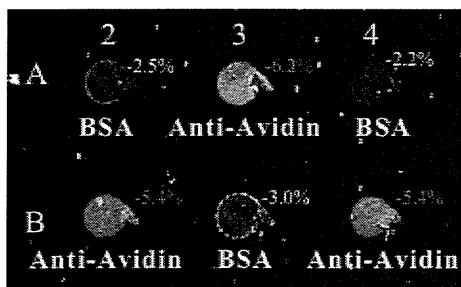


図6 図5の像(b)を像(a)で割った差分イメージ。明るい部分が反射率強度の落ちた割合が大きい部分である。各ドットの右肩の数字は変化の割合を示す。

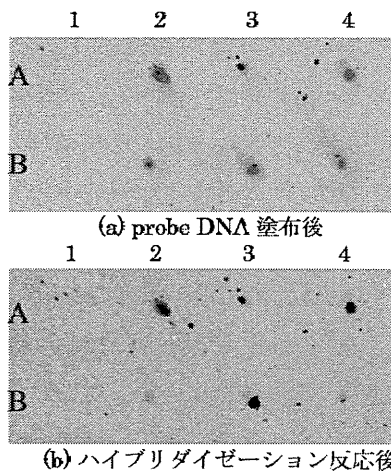


図7 高密度バイオチップによるDNA検出

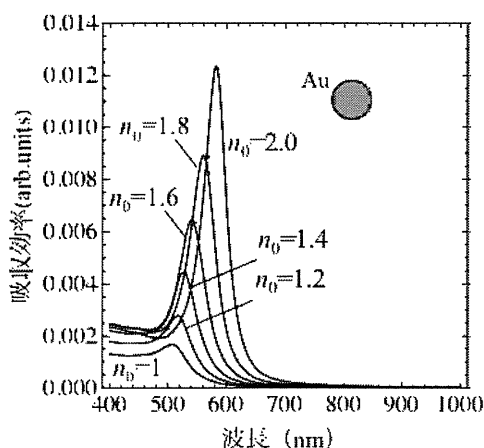


図8 金のみのナノ粒子の吸収スペクトルのシミュレーション。 n_0 は周辺媒質の屈折率。

D. 考察

a. コアシェルによる高感度化

これまで開発してきた局在プラズモンバイオセンサでは、球状の金ナノ粒子を用いてきた。この場合における周辺媒質の屈折率変化に対する吸収スペクトルの変化を理論計算によりシミュレーションした結果が図8である。周辺媒質の屈折率が上がる（分子がナノ粒子に結合することに対応する）とピーク位置がレッドシフトし、吸収量も大きくなることがわかる。屈折率感度は約75nm/RIと見積ることができる。

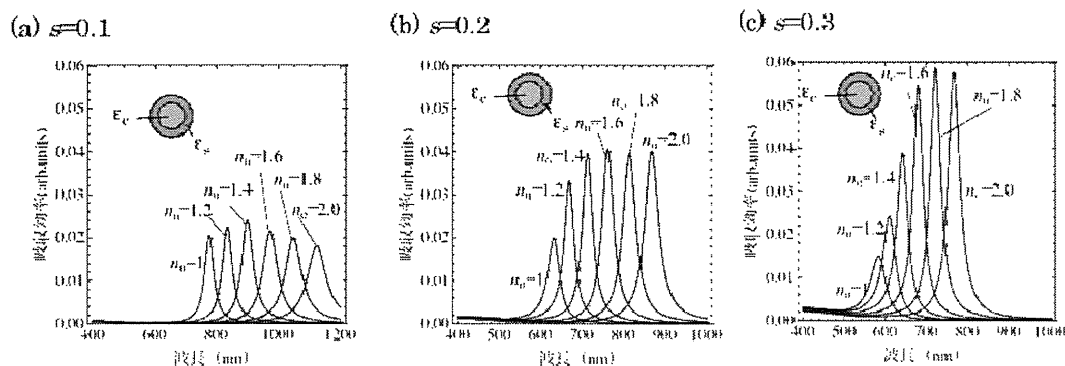


図9 コアシェル構造のシミュレーション結果 ϵ_c はコアの誘電率で2.25を用いている。 ϵ_s はシェル部分の誘電率で金の誘電率を用いた。 s はコアの半径に対するシェルの厚さの割合。

一方、コアシェル構造での周辺媒質の屈折率変化に対する吸収スペクトルの変化をシミュレーションした結果が図9である。ここで、 s はコアの半径に対するシェル層の厚さである。 s が小さいほど吸収ピークは長波長側にシフトしていることがわかる。また、 s が小さいほど単位屈折率に対する吸収波長変化は大きく、 $s=0.1$ では360nm/RI、 $s=0.2$ では240nm/RI、 $s=0.3$ では190nm/RIと見積もることができる。いずれも、金のみのナノ粒子より大きい値を示している。

試料 A(30)の空気中における吸収ピークは785nm付近であり、図9で示すシミュレーション結果の $s=0.1$ に対応する。コアの半径が100nmなので、これはシェルの平均膜厚10nmに対応する。この値は、蒸着時の質量膜厚30nmと一致しない。理由としては、

(a) 図1に示したような作製方法では、コア全体がシェル(金薄膜)で覆われないこと、また、コアの横の部分ではシェルの膜厚が著しく小さくなっていると考えられること

(b) ここで行った計算では、光の遅延効果(位相の効果)を取り入れておらず、計算結果に誤差が生じることが考えられる。

以上より、蒸着時の質量膜厚が30nmの場合には、平均的に膜厚10nm程度のシェルが形成されたと考え、そのときのシミュレーション結果と比較すると良く一致することがわかる。この場合の方が、感度が高くとれるので、本研究の目的を達成する上で支障とはならない。

実験結果から得られた得られた感度は144nm/RIであり、 $s=0.1$ の時に予想される感度より小さい。これは、シェルがコアの約半分程度しか覆っていないためと考えられる。

次に、感度を向上するため金ナノ粒子を固定化した試料B(30)では、屈折率感度として256nm/RIが得られた。この方法により、大きな感度の改善がみられたことがわかる。

一方、試料A(20)の結果からは、追加の金ナノ粒子が無くても屈折率感度400/RIが得られている。これは、膜厚が薄いため、実効的に $s=0.1$ 以下のコアシェル構造が形成されたためであると考えられる。

以上の計算および実験の結果より、コア全体を覆うコアシェル構造でなくても、コアシェルの特性は充分発揮され、1桁におよぶ屈折率感度の向上が可能であることがわかった。コア全体を覆うコアシェル構造は作製に手間がかかり、膜厚の制御も難しい。良質のシェルを作ることにも困難である。また、理論、実験の両面から、シェルの膜厚が薄い方が、高い感度が得られることを見いだした。

b. 高密度蛋白質チップの作成と検出

結果の項で述べたように、アビジン蛋白質を直径60 μm のセンシングドットで検出することに成功した。このドットを100 μm のセパレーションで10 \times 10個並べることにより1 mm^2 に100チャンネルのバイオセンシングドットによるマルチチャンネル検出が可能である。これまで報告されている蛋白質の非標識バイオチップでは、1 mm^2

に1-2チャンネル程度であり、これまでで最も高密度なマルチチャンネルバイオセンシングを達成することができた。

また、DNAでも同様の検出結果が得られており、この手法がウイルスをはじめとする様々なアナライトに対しても有効であることがわかる。

E. 結論

非標識な手法である局在表面プラズモン共鳴を用いた検出手法の高感度化のため、コアシェル構造の検討を行った。基板にポリスチレン球を配列させ、そこへ蒸着するという簡単な方法にもかかわらず、従来の金ナノ粒子に比べて1桁の高感度化に成功した。また、昨年度に開発した表面プラズモン共鳴に類似する手法である金の異常反射を用いた高密度蛋白質チップの作成と検出システムを使って、DNAや蛋白質のマルチチャンネルバイオセンシングに成功した。これらの手法はウイルス検出にも提供が可能であり、簡便な検出手法として期待される。

F. 研究発表

1. 論文発表

1. G. Ramakrishnan, N. Kumar, P. C. M. Planken, D. Tanaka and K. Kajikawa, "Surface Plasmon-enhanced terahertz emission from a hemicyanine self-assembled monolayer", *Opt. Exp.* 20, 4067-4073(2012).
2. D. Tanaka, O. Kuraishi, K. Ozaki and K. Kajikawa, "Electrooptic Properties of Sub-

monolayer Polydiacetylene Nanoparticle Film Probed by Surface Plasmon Resonance Spectroscopy", *Jpn. J. Appl. Phys.*, 51, 032601 (2012) (5 pages).

3. D. Tanaka, H. Karube, M. Shimojo and K. Kajikawa, "Micropatterning of polydiacetylene Nanoparticle Monolayer Based on Ultraviolet or Electron Beam Polymerization", *Appl. Phys. Exp.*, 4, 121604 (2011) (2 pages).

4. D. Tanaka, T. Yamaguchi, G. Gupta, H. Okawa, K. Hashimoto and K. Kajikawa, "Second harmonic generation from hemicyanine self-assembled monolayer on near-hemispherical gold nanoparticles", *J. Phys. D: Appl. Phys.*, 44, 425301 (2011) (7 pages).

5. K. Oishi and K. Kajikawa, "Plasmonic all-optical bistable device based on nematic liquid crystal", *Opt. Commun.*, 284, 3445-3448 (2011).

6. 梶川浩太郎 「表面プラズモンと表面技術」*表面技術*, 62(6), 2-6(2011).

7. 梶川浩太郎 「バイオ分野における表面プラズモンの利用」*応用物理*, 80(9), 785-789(2011).

2. 学会発表

1. 田中大輔, 梶川浩太郎 「表面プラズモン共鳴を利用したPDAナノ粒子のポッケルス効果」、2012年第59回春季応用物理学会(早稲田大学)、2012.3.15-18
2. 山口達矢, 梶川浩太郎 「異なる局在プラズモン共鳴状態を持つ金ナノ粒子の2光子励起発光」、2012年第59回春季応用物理学会(早稲田大学)、2012.3.15-18

3. 梶川浩太郎 「表面プラズモンのライフ分野への応用」、研究会「グリーン&ライフイノベーションに向けた次世代ナノ材料・デバイス」（産業技術総合研究所臨海副都心センター・東京）、2012.1.16（招待講演）

4. 田中大輔・梶川浩太郎 「PDAコアAuシェル構造のプラズモン共鳴特性（Plasmon resonance property of PDA core Au shell structure）」、第9回プラズモニクスシンポジウム（九州大学・福岡）、2012.1.23-24.

5. 梶川浩太郎 「表面プラズモンのバイオセンシング分野への応用」、第1回電子光技術シンポジウム「電子光技術が拓く未来の可能性」- 安全・安心で接続的な社会の実現に向けて-（産業技術総合研究所臨海副都心センター・東京）、2012.2.22（招待講演）

6. 梶川浩太郎 「表面プラズモンのバイオ分野への応用」、次世代ナノ技術に関する時限研究専門委員会 第3回研究会、材料デバイスサマーミーティング2011（機械振興会館・東京）、2011.6.30（招待講演）

G. 知的財産権の出願・登録情報

（予定を含む。）

1. 特許取得

該当なし

2. 実用新案登録

該当なし

3. その他

該当なし

厚生労働科学研究費補助金（医療機器開発推進研究事業）
分担研究報告書

成人T細胞白血病細胞に特異的に発現する糖鎖構造に対する
一本鎖抗体(scFv)に関する研究

研究分担者 有馬直道 鹿児島大学大学院医歯学総合研究科 教授
研究協力者 木地山真美 鹿児島大学工学部生体工学科（隅田研究室、学生）

研究要旨

ATL 細胞である S1T 細胞表層 *N*-型糖鎖、*O*-型糖鎖それぞれを固定化したファイバー型シュガーチップを用いてファージのスクリーニングを行い、*N*-型糖鎖では 30 種類、*O*-型糖鎖では 42 種類のファージを単離した。その後、それぞれのファージから scFv の抽出・精製を行い、得られた 30 種類（*N*-型糖鎖：12 種類、*O*-型糖鎖：18 種類）の scFv について FACS 解析による結合活性を測定した。

FACS 解析の結果、*O*-型糖鎖において S1T 細胞に特異的に結合する scFv 3 種類（O1-2E-K21, O1-2E-K33, O1-2E-K34）が得られた。しかしながら安定性に課題があり、今後検討する予定である。

A. 研究目的

成人細胞白血病(ATL)は、HTLV-1感染に起因するTリンパ球の腫瘍性疾患であり、鹿児島を筆頭に、南西日本に多発している。ATLは他の悪性リンパ腫に比べ、従来の化学療法には極めて不応性であり、新規治療法の開発が急務となっている。研究分担者は、ATL細胞膜表面に存在すると考えられる特異的糖鎖に対する抗体療法の可能性を追究することを目的とし、本研究を行った。

B. 研究方法

実験の流れを図 1,2 に示した。すなわち、ATL 細胞株である S1T 細胞から膜画分を分画し、酵素処理および BlotGlyco 法によって切りだした *N*-型糖鎖は f-mono リンカーでラベル化した後、ファイバー型シュガーチップを調製した。一方、ヒドラジン分解（この部分は、香川

大学の中北准教授に依頼した）および BlotGlyco 法で切りだした *O*-型糖鎖も同様に f-mono リンカーでラベル化した後、ファイバー型シュガーチップを調製した。これらのチップを用いて本学理学部の伊東教授から御供与いただいた M13 由来 ヒト scFv 合成ライブラリーのバイオパニングを行った。チップに結合したファージを大腸菌 TG1 株に感染させ、ファージが移入された大腸菌を選択した。さらにヘルパーファージを重感染させ、モノクローンファージを 42 種類調製した。すべてのモノクローンファージを大腸菌 HB2151 株に感染させ、ペリプラズムから scFv を抽出し、精製を行い 18 種類の scFv を得た。得られた 18 種類に対し、S1T 細胞、および MOLT4 細胞に対する結合活性を調べるために、FACS 解析を行った。

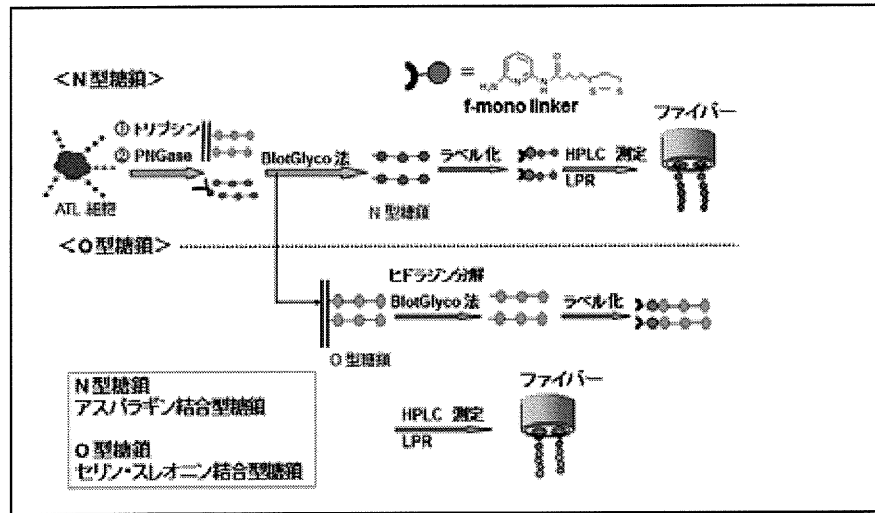


図 1

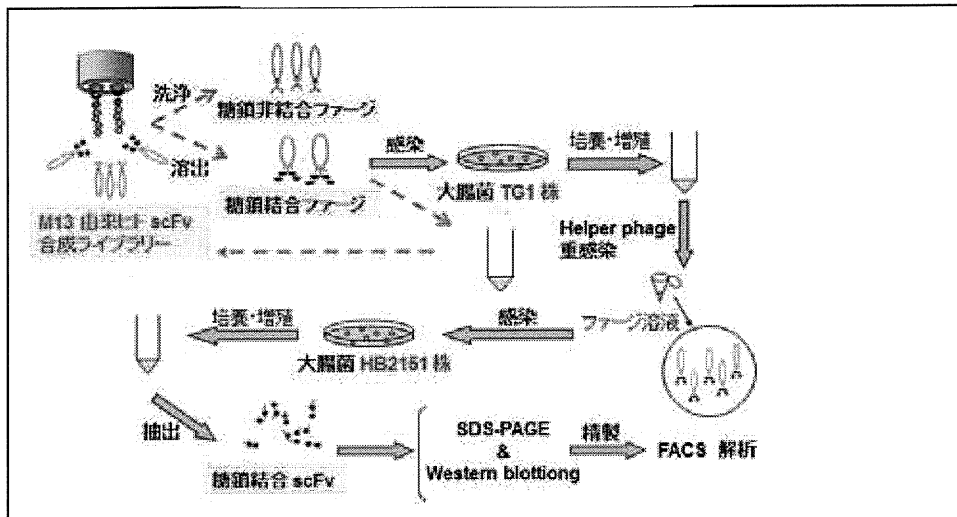


図 2

(倫理面への配慮)

本研究では既に確立している細胞株を用いる実験であり、患者検体は用いていないので、臨床研究倫理委員会などでも倫理審査は必要としていない。また、動物実験や、体細胞遺伝子解析実験も含んでいないので、それらの倫理審査を必要としていない。

C. 研究結果

① colony PCR

TG1 株にファージを感染後、single colony をプレートよりピックアップし、PCR で cDNA を増幅させ、アガロースゲル電気泳動によって遺伝子の存在を確認した。900 bp 付近にバンドが確認できたサンプルだけを次に進めた。900 bp 付近からずれているもの(図 3 サンプル最左)やバンドが薄いサンプル(図 3 サンプル最右側)は除いた結果、N型糖鎖ファイバー型シュガーチップを用いた実験

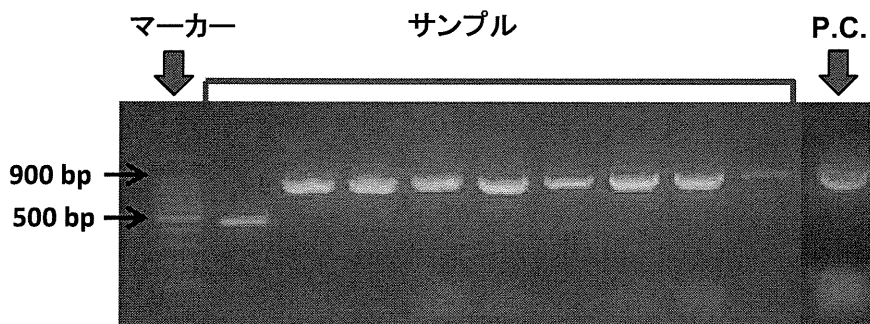


図3 colony PCR の解析結果

(以下 *N*-型糖鎖)では 47 / 56 コロニー、*O*-型糖鎖ファイバー型シュガーチップを用いた実験(以下 *O*-型糖鎖)では 48 / 63 コロニー得ることができた。

②PCR

①でバンドが確認できたサンプルを培養し、モノクローンファージ溶液を作製した後、再度 PCR で確認した。PCR の結果、900 bp 付近に目的のバンドが確認できた(図 4)。ここでも、①と同様に 900 bp からずれているものや薄いサンプルは除いた結果、*N*-型糖鎖では 30 / 47 サンプル、*O*-型糖鎖では 42 / 48 サンプルのファージ溶液を作製することができた。

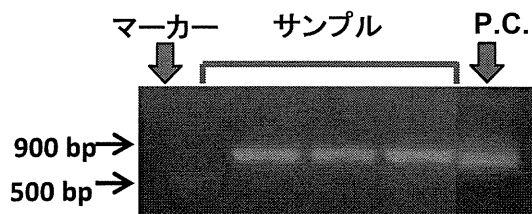


図4 PCR の解析結果

③SDS-PAGE と Western blotting による scFv タンパクの確認

②で得られたモノクローンファージを大腸菌 HB2151 株に感染させ、プレート培地で培養し、得られたシングルコロニーを液体培地で増殖させた後、scFv の発現誘導を行って scFv を産生させた。ペリプラズムから scFv を抽出して SDS-PAGE した後、CBB 染色と Western blotting を行った。CBB 染色の結果、目的の scFv がある 27kDa 付近にバンドを確認でき、Western blotting の結果、27kDa 付近に、His-tag が確認出来た(図 5、6)。His-tag のバンドが 27 kDa より少し高い位置に見えるサンプルも次の精製に進めた(図 5、6 サンプル最右側)。結果、目的の scFv タンパク(27 kDa 付近)を含むサンプルを *N*-型糖鎖では 12 サンプル、*O*-型糖鎖では 18 サンプル回収できた。

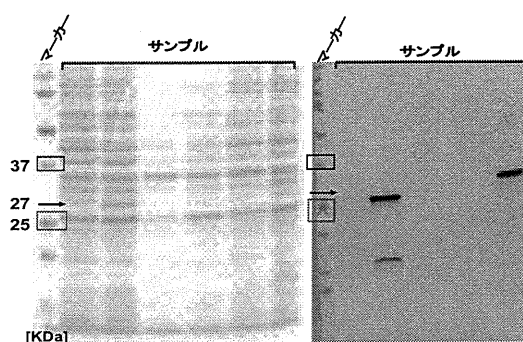


図5 抽出後の SDS-PAGE (左) および
western blotting (右) の結果
N-型糖鎖

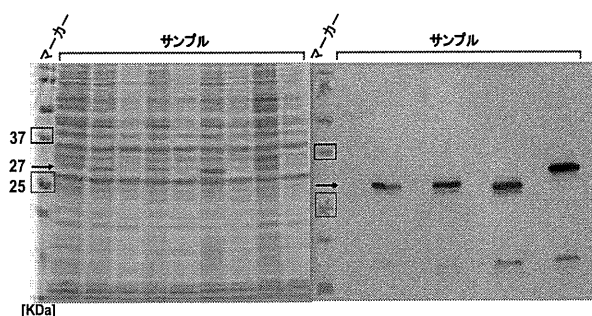


図6 抽出後の SDS-PAGE (左) および
western blotting (右) の結果
O-型糖鎖

④scFv 精製後、SDS-PAGE と Western blotting による確認

抽出した全タンパクから Ni カラムを用いて scFv タンパクを精製した後、再度 SDS-PAGE と Western blotting で確認した。CBB 染色の結果、N-型糖鎖では 12 サンプル、O-型糖鎖では 18 サンプルすべてにおいて余計なタンパクを除いて、きれいな一本のバンドになったことが確認できた。Western blotting の結果でも、すべてのサンプルで 27 k Da 付近に His-tag の確認出来た。

⑤FACS による scFv の結合特性解析

透析・濃縮を行い、十分量を得た scFv に対して FACS 解析による結合特性解析を行った。O-型糖鎖の FACS 解析結果を図 7、8 に示す。S1T 細胞と MOLT4 細胞はそれぞれ 1×10^6 個/ml に調整した。縦軸が細胞数、横軸は蛍光強度を表しており、右へのシフトが大きいほど、結合性は高いことがいえる。Cell only は、細胞に 1 次抗体と 2 次抗体だけ結合させ FACS にかけたもので、S1TA3 は陽性コントロールを示している。グラフが右へシフトしているかで結合しているかを判断した。

FACS 解析の結果、N-型糖鎖では 12 サンプルすべての scFv について S1T 細胞との結合は見られなかった (図略)。

一方、O-型糖鎖では 18 サンプル中 15 サンプルにおいて結合性は見られなかったものの、3 サンプル (O1-2E-K21, O1-2E-K33, O1-2E-K34) について結合性が観測された (図 7)。またこの 3 サンプルは MOLT4 に対する結合性は見られず S1T 細胞に特異的に結合していることが分かった (図 8)。

以上より、scFvO1-2E-K21, O1-2E-K33, O1-2E-K34 はS1T細胞糖鎖に結合し、MOLT4には結合しないことが明らかとなった。しかしながら、今回の実験後、4 度保存もしくは -30°C 保存で、2 1 日後、4 6 日後に同様の測定をした際、ほとんど結合活性が認められなかった。分離精製から短期間の間であれば、同様の活性が確認できたため、このscFvは安定性に問題があるものと考えた。

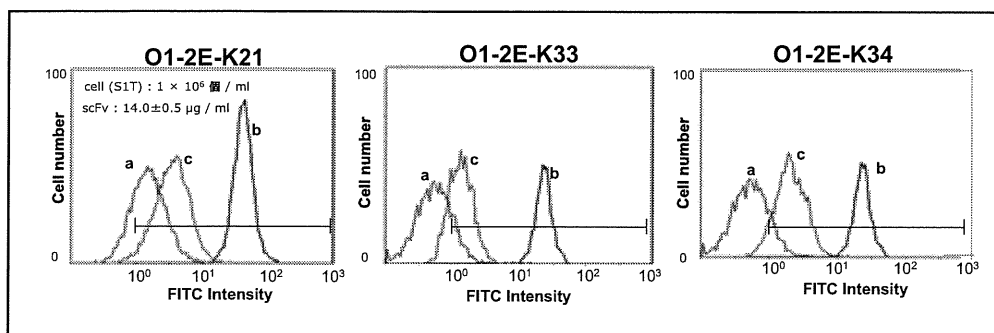


図7 O-型糖鎖 FACS解析の結果 (S1T 細胞)

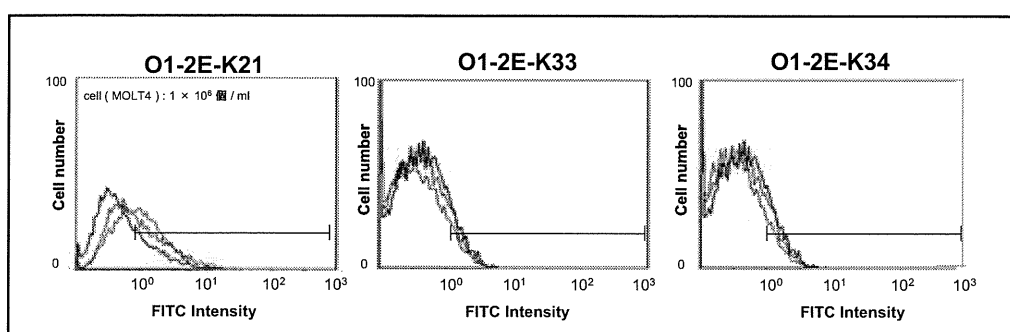


図8 O-型糖鎖 FACS解析の結果 (MOLT4 細胞)

D 考察

成人 T 細胞白血病 (ATL) はヒト T 細胞好性ウイルス I 型が原因である疾患であり、皮膚病変やリンパ腫などの症状が現れるほか、免疫力の低下からさまざまな感染を引き起こす。ATL は発症してしまうと予後が極めて悪い白血病で、骨髄移植も有効な治療法となり得ないのが現状である。

隅田らはこれまでに、HTLV-1 が感染した T 細胞 (ATL 細胞) において糖転移酵素の遺伝子発現について調べた結果、ATL 細胞特有の糖鎖が発現していることが明らかになった。そこで、この ATL 細胞表層の糖鎖に着目し、その糖鎖に特異的に結合する一本鎖抗体 (scFv) を調製することを本研究の目的とした。今回

発見された 3 つの scFv は S1T の細胞膜表面糖鎖に対してかなり特異的に結合すると思われるが、現時点では対応する糖鎖については不明である。今後、対応糖鎖についてのさらなる検討が必要である。また、保存による不安定性についても、その理由は不明であるが、scFv は時にそのような現象がみられるようであり、アミノ酸配列などの特殊性によるものかもしれない。いずれにしても、塩基配列を明らかにし、かつ、ヒト IgG のなかに組み込んだ抗体を作製するなどの工夫を行う予定である。

E 結論

ATL 細胞である S1T 細胞表層 N-型糖鎖、O-型糖鎖それぞれを固定化したファ