

平成24年度特別経費（プロジェクト分）  
「香川グライコリソース（希少糖・ヒト型糖鎖）を用いたナノ糖質生命科学研究推進事業」  
研究グループ別研究成果報告書

（本報告書は、必要に応じてホームページ上で公開しますので、知的財産に関連する記述等については注意してください。）

<b>研究組織</b>				
研究グループの組織について記述してください。メンバーは教員ばかりでなく、本研究に携わっている非常勤職員・学生も記載してください。				
研究課題名	ヒト型糖鎖の大量調製と糖鎖ライブラリーチップの作製			
グループリーダー	氏名	所属・職名	連絡先	
	中北愼一	総合生命科学研究センター・准教授	TEL	
			e-mail	本人 nakakita@med.kagawa-u.ac.jp
			秘書等	glycofun@med.kagawa-u.ac.jp
メンバー	氏名	所属・職名 (学年)	分担事項・役割等	
	中北ゆかり	研究補助	糖たんぱく質の精製、糖鎖切り出し、糖鎖精製、糖鎖構造解析	

## 平成24年度研究成果概要

研究成果概要についてわかりやすく記載してください。できるだけ、図を挿入してください。すでに当該年度に外部に発表を行った成果については、研究業績欄の業績番号と対応させてください。

### ① 糖鎖ライブラリーの充実

我々はこれまで、必要な糖鎖を、どの生体資材から調製すればどの程度の量入手可能かを示す情報地図（糖鎖戦略マップ）の作製をおこなってきた。糖鎖戦略マップには、必要な糖鎖の精製法に関する情報も存在しており、これを利用すれば、gオーダーの糖鎖も入手可能である。本年は、市販の生体資材（主に卵）に関して糖鎖戦略マップの作製をおこなった。種々の生体資材を脱脂後、凍結乾燥をおこない水分を除去した。これを無水ヒドラジンと反応させることで糖たんぱく質から糖鎖を切り出した。切り出された糖鎖の還元末端を2-アミノピリジンで蛍光標識し、ピリジルアミノ化糖鎖（PA糖鎖）を得た。イオン交換HPLC、逆相HPLC、サイズ分画HPLCを使ってPA糖鎖の分離精製と構造解析をおこなった。構造の確認に関しては、エキソグリコシダーゼ消化、質量分析、部分酸水解などの方法を使っておこなった。その結果、これまで調製が難しかった糖鎖を多く含む生体資材が見つかった。精製方法もこれまでより簡便であり、今後はこの生体資材を使って、ヒト型糖鎖の調製をおこなう予定である。また、これまでほとんど入手できなかった糖鎖を2種類検出することに成功した。

### ② ウェルシュ菌が分泌する糖鎖水解酵素の酵素化学的性質の解析

昨年度は、ウェルシュ菌が分泌するシアリダーゼやガラクトシダーゼの酵素化学的性質について詳しく調べた。本年は、昨年度調製することに成功した4種類の糖鎖（ガラクトースに $\alpha 2, 3$ 結合したN-アセチルノイラミン酸：NeuAc  $\alpha 2, 3$ Lac、ガラクトースに $\alpha 2, 6$ 結合したN-アセチルノイラミン酸：NeuAc  $\alpha 2, 6$ Lac、ガラクトースに $\alpha 2, 3$ 結合したN-グリコリルノイラミン酸：NeuGc  $\alpha 2, 3$ Lac、ガラクトースに $\alpha 2, 6$ 結合したN-グリコリルノイラミン酸：NeuGc  $\alpha 2, 6$ Lac）を使って、シアリダーゼの基質特異性を調べた。4種類の糖鎖をシアリダーゼと混合し、37°C、10分間、pH5.0で反応させたところ、NeuAc  $\alpha 2, 3$ Lacを最もよく水解した。次にNeuAc  $\alpha 2, 6$ Lac、NeuGc  $\alpha 2, 3$ Lacの順に水解した。しかしながら、NeuGc  $\alpha 2, 6$ Lacはまったく水解しなかった。コントロールとしてアルトロバクター由来のシアリダーゼの基質特異性を調べてみたところ、NeuAc  $\alpha 2, 3$ Lac、NeuAc  $\alpha 2, 6$ Lac、NeuGc  $\alpha 2, 3$ Lac、NeuGc  $\alpha 2, 6$ Lacの順に水解し、4種類の糖鎖すべてと反応した。また、ウェルシュ菌が分泌するシアリダーゼを使って37°C、24時間、pH5.0で反応させたところ、3種類の糖鎖（1 nmol）に関しては完全にシアリル酸を遊離させたが、NeuGc  $\alpha 2, 6$ Lacはまったく水解されなかった。この結果は、ウェルシュ菌が分泌するシアリダーゼの特徴であると考えられる。この酵素化学的性質を使って、動物の血清由来たんぱく質とシアリダーゼを反応させ、NeuGc  $\alpha 2, 6$ のみを持つ糖たんぱく質を調製し、糖鎖アレイの作製も行った。

### 今後の研究計画

平成24年度に得られた研究成果を踏まえ、今後の研究計画について具体的に記載してください。図を挿入してもかまいません。

①糖鎖ライブラリーをより充実させるため、種々の生体資材（鳥類の卵や動物の臓器など）をヒドラジン分解し、蛍光標識後、各種HPLCを使って構造解析をおこなう。

②得られた糖鎖をネオグリコプロテインに変換し、糖鎖チップの作製をおこなう。

③糖鎖認識たんぱく質（たとえばガレクチン）のX線構造解析やNMR分析を行うための糖鎖リガンドを供給する。

### 特記すべき事項

本研究に関する受賞（学生対象の賞も含む）・プレスリリース・大型外部資金獲得につながった等、特記すべき事項があれば記述してください（ささいなことでもかまいません）。本欄は必須ではありませんので、「該当なし。」でも可ですが、できるだけ記載してください。

特になし

## 研究業績

本研究に関連した、平成24年度中の発表した、[1] 査読がある原著論文 (Corresponding Author には\*印を付す。), [2] 著書, [3] 招待講演, [4] 学会発表 (発表者には○印), [5] 産業財産権 (特許等), [6] その他 (プロシーディング, 査読がない論文, 投稿記事等) を通し番号を付して記入してください。本事業の参加者にはアンダーラインを引いてください。記入欄が足りない場合は、用紙を追加してください。

### [1] 査読がある原著論文

1. Sumiyoshi W, Nakakita S, Miyanishi N, Yamada K, Hasehira K, Nakakita Y, Hirabayashi J. Hypersialylated type-I lactosamine-containing N-glycans found in Artiodactyla sera are potential xenoantigens. *Glycobiology*. 2012, 22(8), 1031-41
2. Sriwilaijaroen, N., Kondo, S., Yagi, H., Hiramatsu, H., Nakakita, S., Yamada, K., Ito, H., Hirabayashi, J., Narimatsu, H., Kato, K. and Suzuki, Y. Bovine milk whey for preparation of natural N-glycans: structural and quantitative analysis. *Open glycoscience* 2012, 5, 41-50

### [2] 著書

### [3] 招待講演

### [4] 学会発表(○は発表者)

中北慎一、中北ゆかり、山田佳太、内山 昇、住吉 渉、鈴木康夫、平林 淳 大量調製した PA 糖鎖を利用したネオグライコプロテインの作製 第31回日本糖質学会年会, 2012年9月 (鹿児島)

### [5] 産業財産権 (特許等)

### [6] その他 (プロシーディング, 査読がない論文, 投稿記事等)