

平成25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。）

研究組織				
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25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 糖鎖ライブラリーチップの作製

レクチンや抗体と糖鎖の結合特異性を調べる際、天然の糖たんぱく質を使う場合がある。しかしながら、天然の糖たんぱく質上に存在する糖鎖は、類似構造の混合物であり、それらを直接用いて結合特異性を精度高く調べることは難しい。我々がこれまで構築してきたヒト型糖鎖ライブラリーを使い、大量調製した糖たんぱく質糖鎖を使い、単一構造で多価の糖鎖を持つ糖たんぱく質（neoglycoprotein）の合成の検討及び、得られた neoglycoprotein をガラススライドに固定することで、糖鎖のアレイ化（糖鎖ライブラリーチップ）を行った。

種々の生体資材に含まれる糖たんぱく質からヒドラジン分解により糖鎖を切り出し、還元末端を2-アミノピリジンで標識後各種クロマトグラフィーを使って単一標品に精製した。得られたピリジルアミノ化糖鎖を接触還元後、無水ヒドラジンと反応させることでピリジン環を脱離させ、1-アミノ-1-デオキシ誘導体にした。これを2価の架橋剤を使ってウシ血清アルブミンのアミノSH基(システイン残基)に導入することで目的の neoglycoprotein を得た。また、遊離型で入手可能なオリゴ糖や市販されている *p*-Nitrophenyl 誘導体についても同様に、アミノ基を介してウシ血清アルブミンのシステイン残基に導入し neoglycoprotein を調製した。以上得られた neoglycoprotein をエポキシ活性基でコートされたガラス基板上に固定し、Cy3 標識した市販のレクチンや微生物由来のヘマグルチニン（シアル酸を認識する糖鎖認識たんぱく質）と反応させたところ、エバネッセント波励起式スキャナーを使って高感度に測定可能であることが確認された。また、インフルエンザウイルス粒子との結合実験が可能であるかを検討したところ、ウイルスを直接蛍光標識した場合でも、抗体を介したオーバーレイ方式でも結合を確認した。

今後の展望

本事業期間内（平成22～25年度）に得られた研究成果を踏まえ、今後の研究発展の展望について記載してください。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。
- ④糖鎖ライブラリーチップを使ってウイルスの結合特性を明らかにする

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25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. Imamura T, Okamoto M, Nakakita S, Suzuki A, Saito M, Tamaki R, Lupisan S, Roy CN, Hiramatsu H, Sugawara KE, Mizuta K, Matsuzaki Y, Suzuki Y, Oshitani H. Antigenic and receptor binding properties of enterovirus 68. J Virol. 2014, 88(5), 2374-84.
2. Nonaka Y, Ogawa T, Oomizu S, Nakakita S, Nishi N, Kamitori S, Hirashima M, Nakamura T. Self-association of the galectin-9 C-terminal domain via the opposite surface of the sugar-binding site. J Biochem. 2013, 153(5), 463-71.

[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, 住吉 渉, 宮田 茂,, 神鳥成弘, 平林 淳、ウエルシュ菌が分泌するシアリダーゼの基質特異性 第32回日本糖質学会年会, 2013年8月(大阪)

[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)