

平成22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

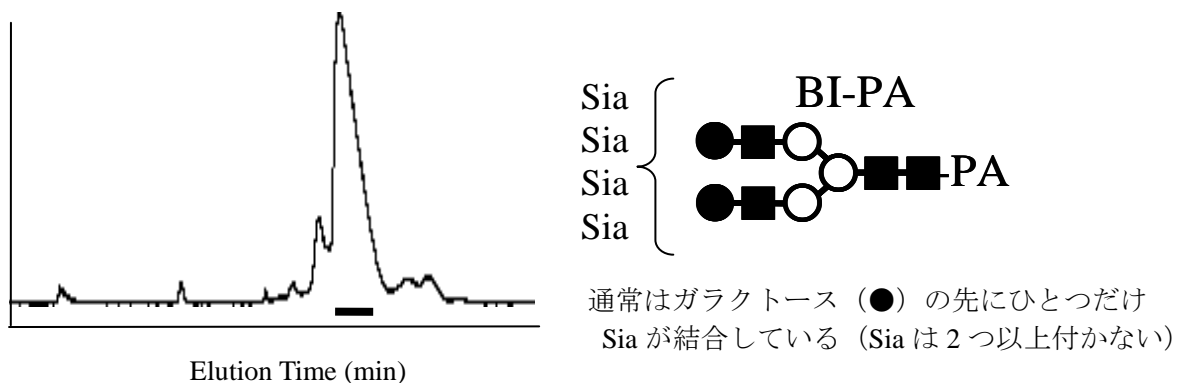
研究組織					
中北愼一、中北ゆかり					
研究課題名	ヒト型糖鎖の大量調製と糖鎖ライブラリーチップの作製				
グループリーダー	氏名	所属・職名	連絡先		
	中北愼一	総合生命科学研究センター・准教授	e-mail	本人	nakakita@med.kagawa-u.ac.jp
				秘書等	glycofun@med.kagawa-u.ac.jp
メンバー	氏名	所属・職名 (学年)	分担事項・役割等		
	中北ゆかり	研究補助	糖たんぱく質精製、糖鎖切り出し、糖鎖精製、糖鎖構造解析		

平成 22 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。なお、本欄は、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。

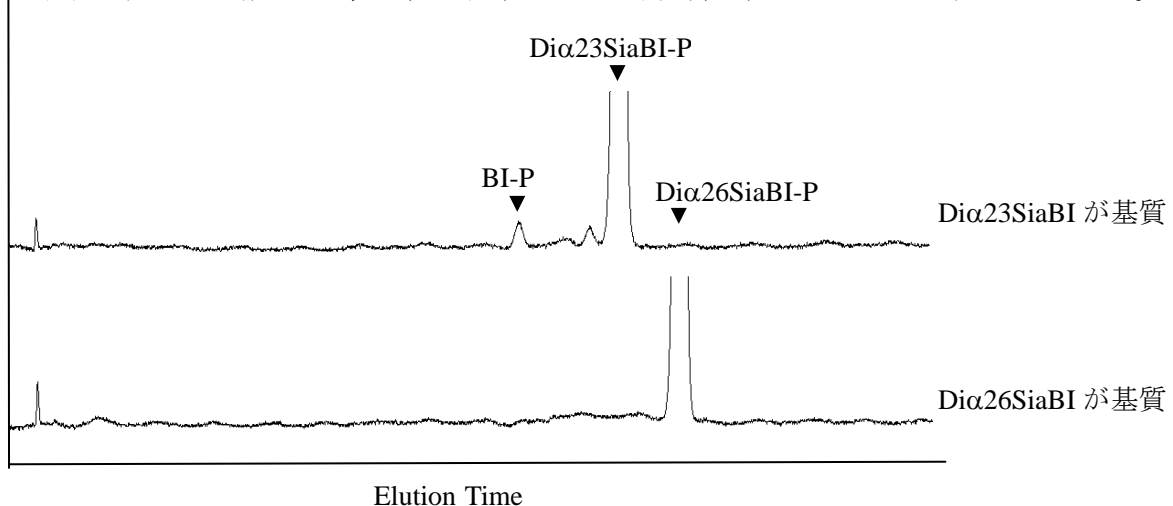
① 糖鎖ライブラリーの充実（糖鎖チップ作成に必要な糖鎖の大量調製）

糖鎖は遺伝子やたんぱく質と異なり、PCR や大腸菌を使って増やすことができない。なぜなら、糖鎖は遺伝子の二次産物（糖鎖合成は糖転移酵素や糖鎖分解酵素などの糖鎖合成酵素がおこなう）であるため、単一構造の糖鎖を大量（たとえば mg オーダー）で入手することが困難であった。我々はニワトリの卵のような安価で入手が安易な生体資材を原料にヒドラジン分解を使って糖鎖を切り出し、2-アミノピリジンを使った蛍光標識法（PA 化）を使って PA 糖鎖の調製を行った。この PA 糖鎖を各種 HPLC で分離することによって、必要な糖鎖（例えば、ヒトの組織に発現している糖鎖：ヒト型糖鎖）をどの原料から、どのような精製法を使って調製すれば、どのくらいの量の糖鎖を入手できるかを示す地図（糖鎖戦略マップ） および糖鎖ライブラリー作製を行ってきた。この糖鎖戦略マップと糖鎖ライブラリーを利用することによって、ガレクチンが認識するような糖鎖を入手し、X 線構造解析や NMR 解析を可能にした。本年は下記に示すような二本鎖型糖鎖でありながらシアル酸が 4 つ結合しているような糖鎖（高シアルル化糖鎖）の入手法の確立を行い、5 種類新たな糖鎖をライブラリーに増やすことができた（下図は PA 糖鎖精製時の HPLC チャート）。



② ウェルシュ菌糖鎖プロセッシング酵素の基質特異性に関する研究（医学部岡部・宮田グループと共同で実施）

ウェルシュ菌には多くの糖鎖分解酵素が存在している。その中の 2 種類のシアリダーゼに注目し、その基質特異性について糖鎖ライブラリーを使って分析を行った。シアル酸をガラクトースの先に 1 残基ずつ持つような糖鎖でシアル酸の結合様式が異なるもの（ $\text{Dia}23\text{SiaBI-PA}$ と $\text{Dia}26\text{SiaBI-PA}$ ）を用いてウェルシュ菌シアリダーゼと反応させたところ、両方のシアリダーゼともに α 2-6 結合より α 2-3 結合した糖鎖の方をより素早く切断することがわかった。糖鎖のコア構造に関しては酵素の基質特異性にはほとんど影響を与えないことも明らかになった。シアル酸は動物細胞の表面に見られる糖であり、細菌やウイルスの感染防御に役立っていると考えられている。



今後の研究計画

平成 22 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 糖鎖チップ作製用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行い、どのような生体資材が糖鎖の調製に利用可能のスクリーニングを行う。具体的には魚類の卵に存在する糖鎖について調べる。これらの生体資材は、食品として利用されているので、いつでも安価に入手可能であり、これらを使って5種類の糖鎖を調製する方法論を確立する。
- ② ウェルシュ菌が分泌する糖鎖水解酵素の基質特異性の解析をおこなっていく。特に、ガラクトース分解酵素に関する分析をおこなう。また、これまでに行ってきた糖鎖分解酵素（シアリダーゼ、N-アセチルグルコサミニダーゼ）について糖鎖ライブラリーを使ってより詳細な基質認識解析を行う。
- 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，[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。なお，本欄は，必要に応じてホームページ上で公開します。

[1] 査読がある原著論文

1. Miyanishi N, Nakakita S, Sumiyoshi W, Okuma H, Izumori K, Hirabayashi J.
Development of D-allose sensor on the basis of three strategic enzyme reactions. Biosens Bioelectron. 2010 26(1):126-30.
2. Sumiyoshi W, Nakakita S, Hasehira K, Miyanishi N, Kubo Y, Kita T, Hirabayashi J.
Comprehensive analysis of N-linked oligosaccharides from eggs of the family Phasianidae. Biosci Biotechnol Biochem. 2010;74(3):606-13..
3. Hasehira K, Nakakita S, Miyanishi N, Sumiyoshi W, Hayashi S, Takegawa K, Hirabayashi J. A comprehensive HPLC analytical system for the identification and quantification of hexoses that employs 2-aminobenzamide coupling. J Biochem. 2010 147(4):501-9.

[2] 著書

該当なし。

[3] 招待講演

該当なし。

[4] 学会発表(○は発表者)

1. K Hasehira, ○S Nakakita, N Miyanishi, W Sumiyoshi, S Hayashi, K Takegawa, J Hirabayashi.(2010). Comprehensive HPLC Analytical System for the Identification and Quantification of Hexoses that Employs 2-aminobenzamide coupling. The 25th International Carbohydrate Symposium, Aug. 2010, Tokyo-Chiba, Japan
2. ○住吉 渉、中北 慎一、馳平 加代、宮西 伸光、久保 勇樹、喜田 孝美、平林 淳「キジ科鳥類卵由来 N-結合型糖鎖の構造比較分析」2010 年度日本農芸化学会、2011年3月（東京）

[5] 産業財産権（特許等）

糖鎖の製造方法

出願番号：特願 2010-181592

出願日：平成 22 年 8 月 16 日

出願人：国立大学法人香川大学

発明者：中北慎一、住吉渉、平林淳

[6] その他（プロシーディング，査読）

該当なし。