

## 学位論文の要旨

氏名

新地 浩之

学位論文題目

糖鎖固定化蛍光性ナノ粒子を活用した糖鎖機能解析及び検査診断ツールに関する研究

本論文は、糖鎖固定化蛍光性ナノ粒子（SFNP）を活用した糖鎖機能解析ツールの開発ならびに検査診断ツールの開発についての研究成果をまとめたものである。

第一章では、序論として本研究の背景と意義について述べる。

糖鎖は、全ての細胞に存在し、糖タンパク質や糖脂質などの形で存在する生体分子で、特定のタンパク質との相互作用を通して、細胞の分化や増殖、ガン化、細菌・ウイルス感染などに関与する。糖鎖の構造は、複雑で多様性が高いため、生体機能に直結した分子構造を特定することが難しい。また、核酸やタンパク質に比べると相互作用解析の手法も限られており、分子レベルでの糖鎖機能の理解のためには、新規ツールが必要である。そこで本研究では、SFNPを用いた簡便な糖鎖機能の解析ツールの開発と検査診断ツールへの応用を検討した。

第二章では、シュガーチップおよびSFNPを用いたガングリオシド結合性タンパク質との相互作用解析について述べる。

ガングリオシドはスフィンゴ糖脂質に分類される糖脂質で、脳や神経系に分布し、様々な生体機能や疾患に関与している。ガングリオシドの機能発現には、集合化による細胞表層の脂質ドメイン構造の形成（ラフトの形成）が重要であると考えられているが、ガングリオシドの集合化度の解析は非常に困難である。ガングリオシド結合性のタンパク質を用いた組織染色による解析も知られているが、ガングリオシドの集合化度を定量的に評価することは難しく、これらの集合化度を簡便に評価できる解析ツールの開発が求められている。そこで本章では、糖鎖構造や糖鎖密度の制御が可能な、シュガーチップおよびSFNPに着目し、糖鎖成分にガングリオシド糖鎖を用いて、ガングリオシド結合性タンパク質との相互作用解析を行った。

まず、当研究室で開発されているシュガーチップを用いて、ガングリオシド糖鎖との相互作用が期待される糖鎖結合性タンパク質を用いたSPR解析を行った。ガングリオシド糖鎖の集合化度は、タンパク質との親和性が低いTEG-monoを用いて糖鎖密度をコントロールしたシュガーチップを調製して評価した。その結果、糖鎖密度と流速によって糖鎖-タンパク質間の相互作用が異なることが分かった。この現象は、拡散律速条件下で見られることから、シュガーチップとタンパク質間に複数の結合モードが存在することが示唆された。複数の結合部位を持つタンパク質とチップ上の糖鎖間では、クラスター効果が主として働くことが考えられ、タンパク質の結合部位の数や配向、またチップ上の糖鎖の距離、配向が相互作用に重要であることが示唆された。一方、6種類の異なるガングリオシド糖鎖を固定化したSFNPを調製し、レクチンとの凝集実験を行ったところ、固定化したガングリオシド糖鎖の構造によって特異的な凝集体が生成することが分かった。また、TEG-monoを用いて糖鎖密度をコントロールしたSFNPと凝集体が観察されたレクチンの相互作用解析を行ったところ、固定化した糖鎖密度により結合親和性が変化したことから、SFNPはレクチンとの相互作用解析だけでなく、相互作用に必要な糖鎖の集合化度の解析にも利用できることが示唆された。

第三章では、SFNPを用いた免疫性末梢神経疾患簡易診断法の開発について述べる。

免疫性末梢神経疾患の一種であるギラン・バレー症候群（GBS）やミラー・フィッシャー症候群（FS）は、急速な手足の運動麻痺を示す神経・筋疾患であり、臨床現場ではしばしば脳卒中と誤診される。これらの疾患では、ELISA法による、血清中の抗ガングリオシド抗体の検出が補助診断として有効である。しかし、検査会社に検査を依頼すると、分析結果が得られるまでに1週間以上かかることから、迅速簡便な検査診断法が求められている。そこで本研究では、SFNPを用いた免疫性末梢神経疾患の簡易診断法を開発すべく、ガングリオシド糖鎖を固定化したSFNPによる抗ガングリオシド抗体の検出について検討した。

まず、ガングリオシド糖鎖を固定化したSFNPを用いて、GBS患者血清に含まれる抗ガングリオシド抗体との凝集反応について検討した。その結果、ガングリオシド結合性レクチンの場合と同様に、抗体に特異的な凝集体が生じることが分かった。抗体の検出時間の短縮についても検討したところ、糖鎖の固定化密度を最適化することで検出時間を短縮できることが分かった。次いで、ELISA法との検出感度を比較するために、GBS患者血清50例を含む血清100例を用いた凝集実験を行ったところ、ELISA法と同等の検出感度で抗ガングリオシド抗体を検出できることが分かった。本法は、SFNP溶液と血清を混合するだけで数時間以内に抗体の有無を目視で観察できるため、ELISA法に比べて非常に簡便な検査診断法であり、臨床現場で有効な診断方法になることが期待される。

第四章では、ZnS-AgInS<sub>2</sub>/ZnSナノ粒子をコアに持つ低毒性SFNPの調製と機能解析および検査診断ツールへの応用について述べる。

これまでに開発されたSFNPは、コア成分に細胞毒性の高いカドミウムを含むQDを使用しており、検査診断ツールやイメージングツールへの実用化に向けて、生体毒性や環境負荷の低減が課題である。そこで本研究では、SFNPのコア成分にカドミウムを含まないZnS-AgInS<sub>2</sub>/ZnSナノ粒子（ZAIS/ZnS NP）を用いた低毒性SFNPの調製とその応用について検討した。

従来のZAIS/ZnS NPを用いたSFNPの調製法は、カドミウム系QDで構成されるSFNPの5倍量の糖鎖リガンド複合体が必要なため、まず、効率良く糖鎖を固定化できる調製条件の検討を行った。糖鎖固定化後の安定性を高めるために重要なZAIS/ZnS NPの再シェル化の条件を検討したところ、再シェル化反応時のpHにより、その後の糖鎖固定化量が変わることが分かり、これまでの40%の糖鎖リガンド複合体量で、効率良く糖鎖を固定化できることが分かった。続いて、調製したSFNPの毒性評価を行ったところ、ZAIS系SFNPはカドミウム系SFNPに比べて毒性が低く、250 µg/mLのSFNPを加えて24時間培養しても、ほとんど細胞毒性を示さなかった。次に、調製したSFNPを免疫性末梢神経疾患簡易診断法へと応用するために、ガングリオシド糖鎖を固定化したSFNPを用いて抗ガングリオシド抗体の検出について検討したところ、カドミウム系SFNPの場合と同様に、抗ガングリオシド抗体との特異的な凝集体が生じることが分かった。調製した低毒性SFNPは、安全性の高い解析ツールとして今後の実用化が期待される。

第五章では、本研究の総括を述べる。

本研究では、SFNPを用いた糖鎖の機能解析ツールや検査診断ツールの開発について検討した。その結果、糖鎖結合性タンパク質の機能解析ツールとして、また免疫性末梢神経疾患の簡易診断ツールとして利用可能であることが分かった。近年、ガンをはじめとする様々な疾患において、血清中に抗糖鎖抗体などの糖鎖結合性分子が存在することが明らかになっており、糖鎖構造や糖鎖密度の制御が可能なSFNPは、様々な疾患特異的な糖鎖結合性分子の検出が可能だと考えられ、幅広い疾患の診断ツールとしての利用が期待できる。また本研究では、カドミウムフリーの低毒性SFNPの調製についても検討し、ZAISナノ粒子への効率的な糖鎖の固定化法を見出した。ZAIS系SFNPは細胞毒性が低く、環境負荷が小さいため、より安全かつ簡便な解析ツールとしての利用が可能である。SFNPは、イメージングツールとして利用することも可能であり、今後は、糖鎖が関与する生体機能の解明や疾患の診断法の開発、糖鎖機能を活用した薬剤の選択的輸送法の開発など多方面への応用が期待される。

## Summary of Doctoral Dissertation

Title of Doctoral Dissertation:

Study on Sugar Chain-Immobilized Fluorescent Nanoparticles for Functional Analysis and Diagnostic Use

Name: Hiroyuki Shinchi

Sugar chains play a significant role in a variety of biological events such as cell-cell recognition, proliferation, and infection. The interaction between sugar chains and proteins or sugar chains themselves is the initiating point for these events. To date, numerous efforts have been devoted to the study of their function, which is, however, not well-understood compared to nucleic acids or proteins because of the structural complexity and diversity. In this thesis, the application of sugar chain-immobilized fluorescent nanoparticles (SFNPs) for functional analysis and diagnostic use is described.

In Chapter 1, background and purpose of this research are described.

In Chapter 2, the interaction study of ganglioside-binding protein using surface plasmon resonance (SPR) sensor and SFNPs as an analytical tool is described. Gangliosides, one of glycosphingolipids, are involved in various biological events. However, its functional analysis is quite difficult because cluster structure is important to fulfill their functions. In an SPR analysis, ganglioside-immobilized Sugar Chip with varied sugar density was used, and binding property of ganglioside-binding protein was evaluated. SFNPs were also prepared, on which the density of sugar chain was also varied. In this chapter, binding mode of ganglioside-binding proteins was investigated on the basis of the sugar-chain density.

In Chapter 3, the development of novel, simple, and convenient diagnostic method for autoimmune peripheral neuropathy using SFNPs is described. Guillain-Barré syndrome (GBS) and Millar Fisher syndrome (MFS) are autoimmune peripheral neuropathy, causing acute flaccid paralysis. Patients of these diseases are often misdiagnosed as having a stroke. ELISA is generally used as a definite diagnosis of GBS or MFS since anti-ganglioside antibodies are detected in their sera. However, it takes several days to receive the assay results from diagnostic laboratory. Therefore, the quick and simple point of care diagnostic kit is desired. In this chapter, novel method for the detection of the anti-ganglioside antibodies in serum using SFNPs was developed.

In Chapter 4, preparation and application of low toxic SFNPs as diagnostic and imaging tools is described. To date, various SFNPs have been synthesized and their biological applications have been explored. However, the core component of most SFNPs contains cadmium ions, which is often problematic for its practical use because of their toxicity and higher environmental load. Therefore, cadmium free or low toxicity SFNPs is strongly desired. In this chapter, cadmium-free SFNPs using low toxic ZnS-AgInS<sub>2</sub>/ZnS nanoparticles (ZAIS/ZnS NPs) was developed and they were applied to diagnostic use in autoimmune peripheral neuropathy.

In Chapter 5, the results of this study are summarized.