

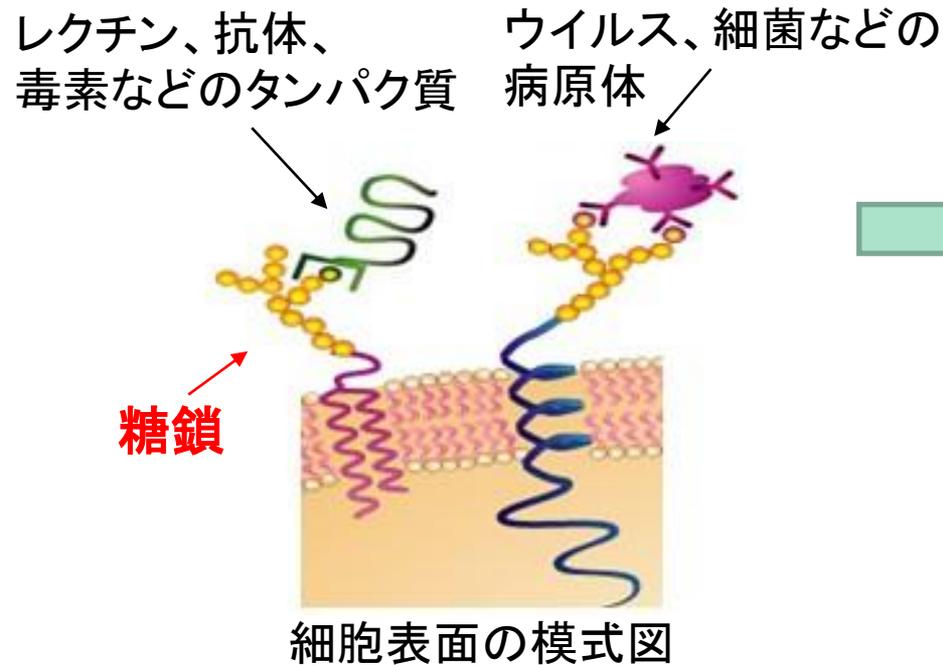
糖鎖固定化アレイご紹介資料

◆ 住友ベークライト株式会社
S-バイオ事業部

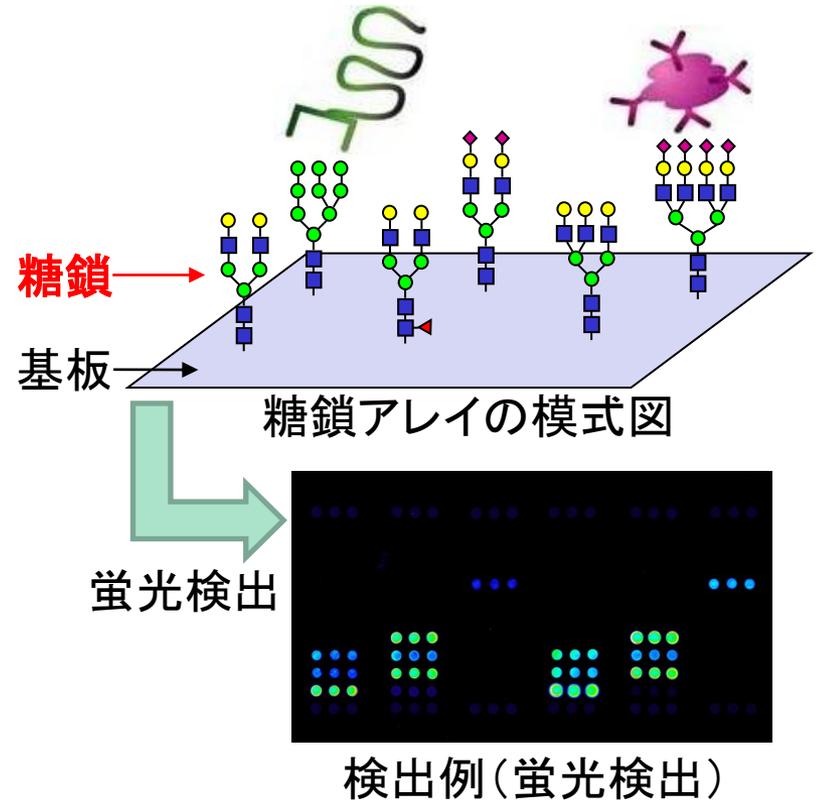
糖鎖固定化アレイとは・・・

基板の上に多種類の糖鎖を固定化したデバイス

生体中で起こっている反応を・・・

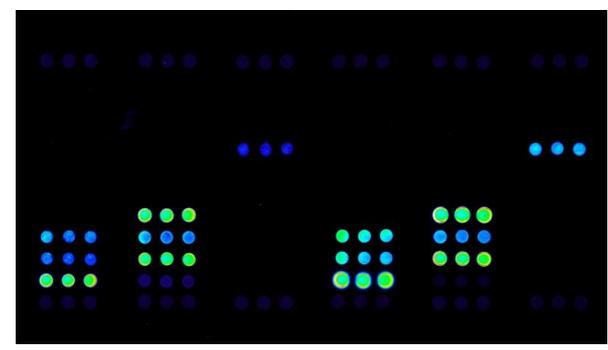
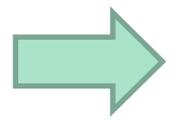
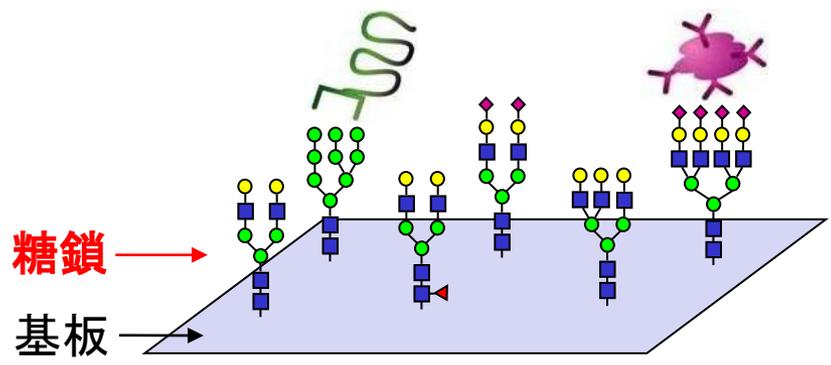


糖鎖固定化アレイの上で再現！



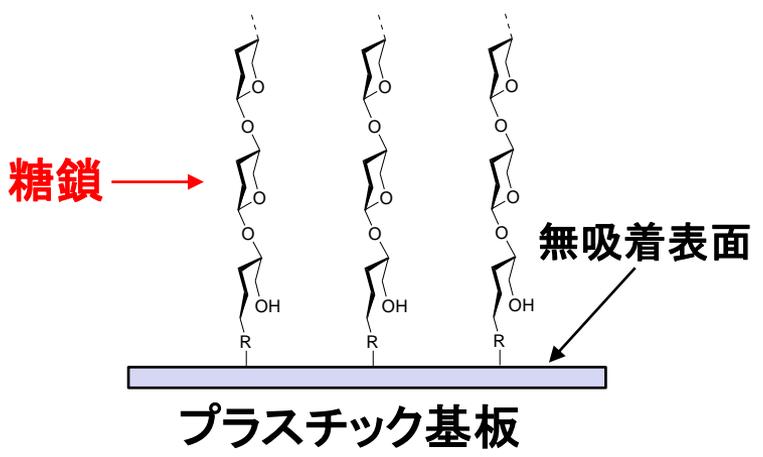
様々な糖鎖と生体分子との相互作用をハイスループットに検出可能
→ 癌、感染症などの創薬研究や治療法開発を推進

住友ベークライトの糖鎖固定化アレイの特長



糖鎖固定化方法

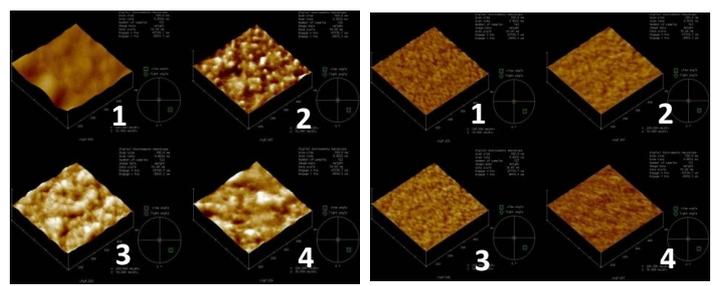
糖鎖の還元末端を基板に固定化



- 糖鎖に特別な化学修飾が不要
- 様々な糖鎖を簡便に固定化可能

AFMによる無吸着表面の直接観察結果

基板表面への独自の表面処理技術

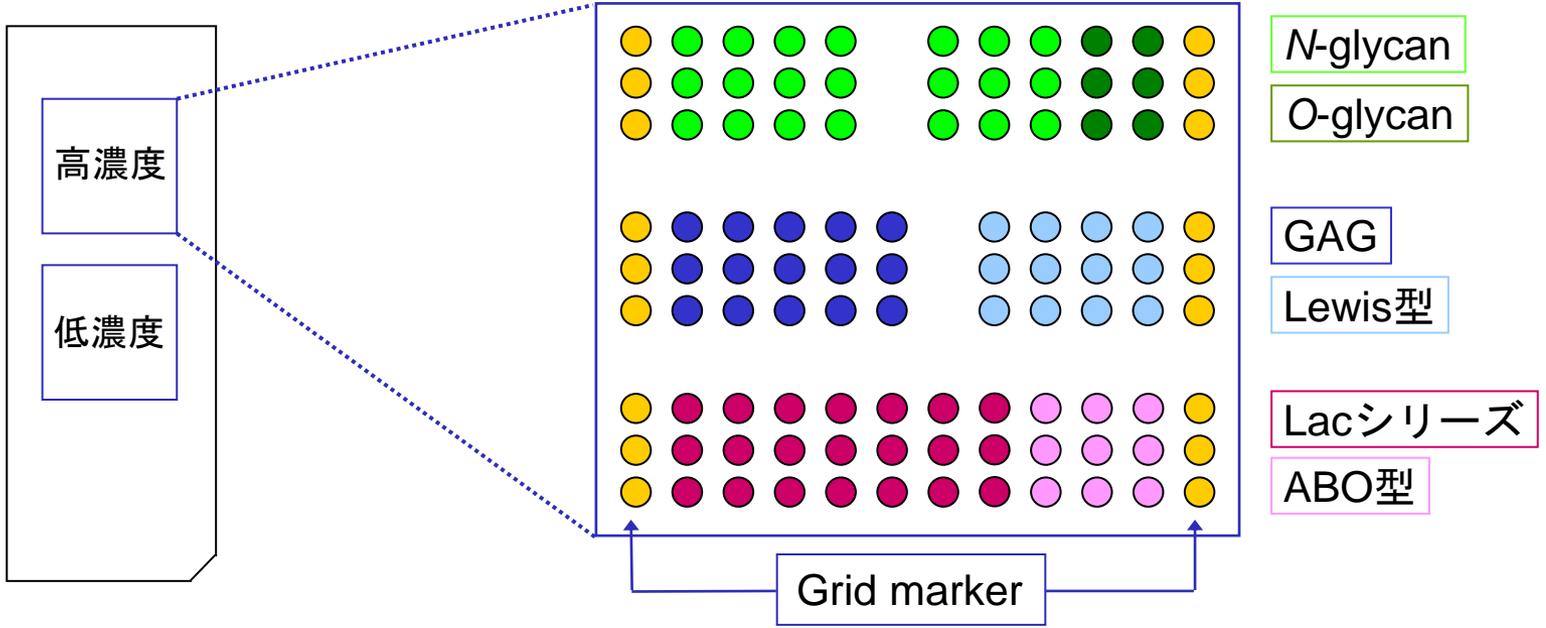


- 1: Control
- 2: TGF-β
- 3: Erythropoietin
- 4: Histone H1

通常のポリプロピレン 無吸着表面処理されたポリプロピレン

- タンパク質の非特異的な吸着を抑制
- 糖鎖の微弱な相互作用を高S/N比で検出

①糖鎖固定化アレイ(28種類の糖鎖)



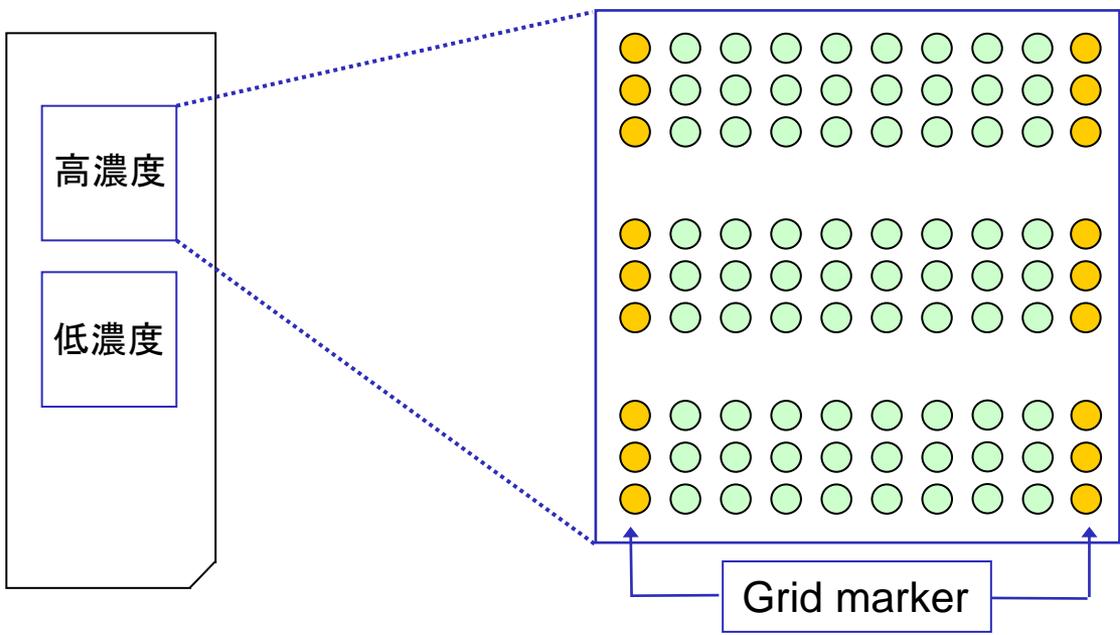
固定化糖鎖濃度

•高濃度 :	0.5mg/mL	(GAG)
	0.2mM	(N-glycan)
	1.0mM	(other glycans)
•低濃度 :	0.1mg/mL	(GAG)
	0.04mM	(N-glycan)
	0.2mM	(other glycans)

固定化糖鎖構造(28種類)

•N-glycan	... M9、NA2、A2、NA2F、NA3、A3、NA4	7種類
•O-glycan	... STn、T	2種類
•GAG	... Heparin、Desulfated heparin (4種類)	5種類
•Lewis型	... Le ^a 、Le ^x 、SLe ^a 、SLe ^x	4種類
•Lacシリーズ	... Lac、 α 2-3Sialyl Lac、 α 2-6Sialyl Lac α 2-3Sialyl LacNAc、 α 2-6Sialyl LacNAc Lacto-N-tetraose、Lacto-N-neo-tetraose	7種類
•ABO型	... A trisaccharide、B trisaccharide O disaccharide	3種類

②糖脂質糖鎖固定化アレイ(24種類の糖脂質糖鎖)

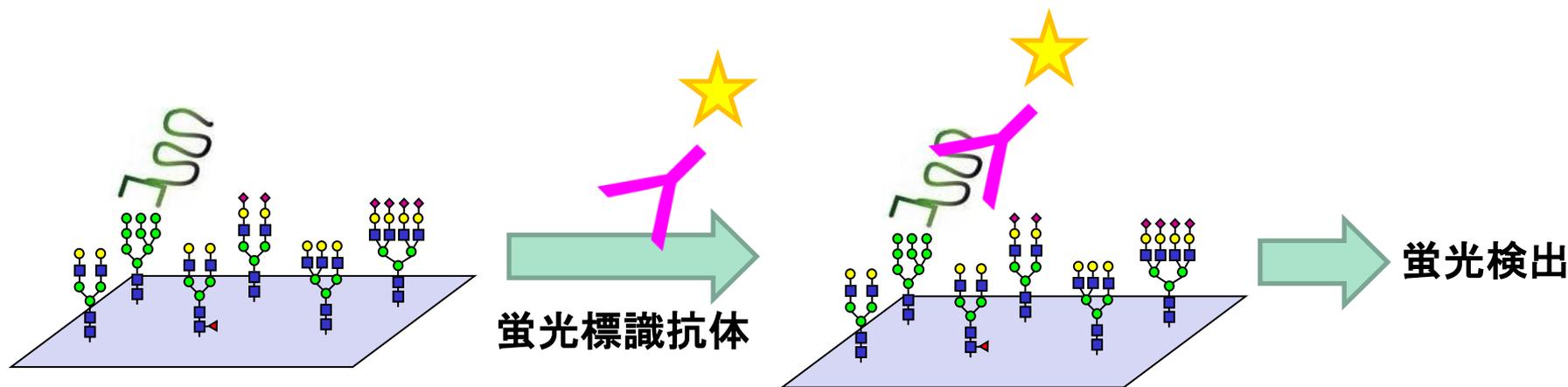
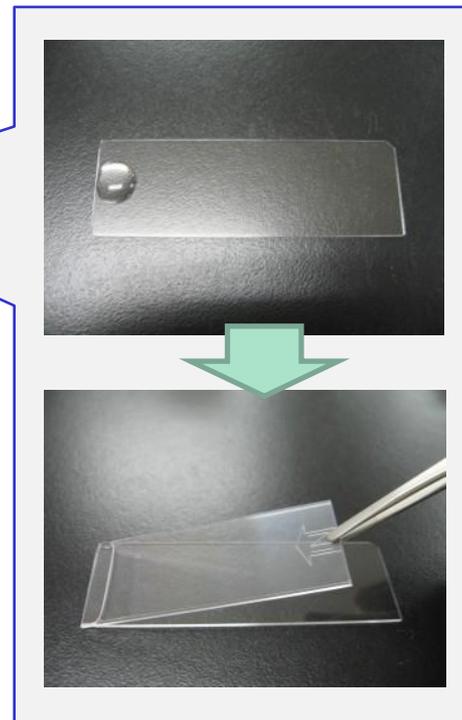


固定化糖鎖濃度
 ・高濃度 : 0.25mM
 ・低濃度 : 0.1mM

固定化糖鎖構造(24種類)
 ・ガングリオシド系
 GM3、GD3、GT3、GM2、GD2、GT2、GM1a、GM1b、
 GD1a、GD1b、GT1a、GT1c、GA1 (asialo GM1)、
 Fucosyl GM1、GA2 (asialo GM2)
 ・グロボ系
 Gb3 (P^k antigen)、Gb4 (P antigen)、Gb5 (SSEA-3)、
 Globo-H (SSEA-3)、Globo-A、Globo-B、SSEA-4 tetraose、
 SSEA-4 hexaose、Forssman antigen

糖鎖固定化アレイの実験例

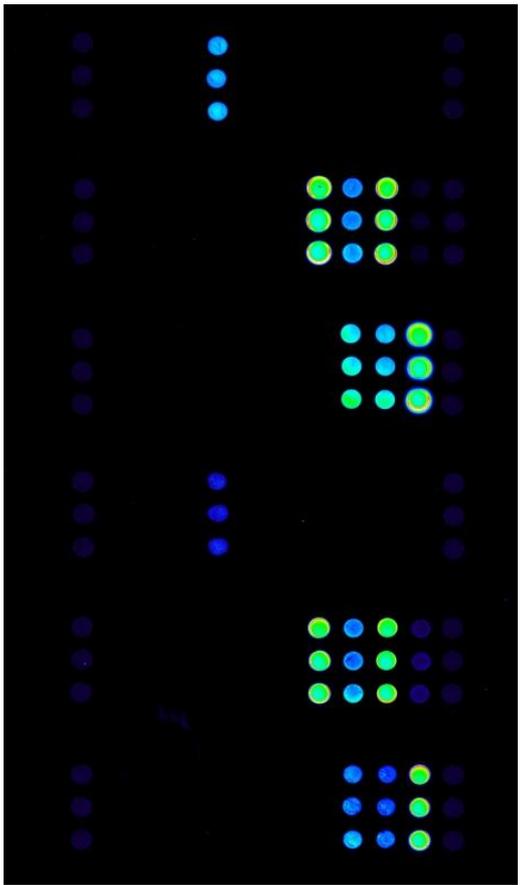
1. 糖鎖固定化アレイ表面に測定試料溶液を載せ、ハイブリカバーを被せて溶液を表面全体に展開する
2. 加湿環境下で一定時間静置後、アレイを洗浄
3. 測定試料に対する蛍光標識抗体溶液を、手順1と同様に表面全体に展開する
4. 加湿環境下で一定時間静置後、アレイを洗浄
5. マイクロアレイ用スキャナで基板上の蛍光を検出



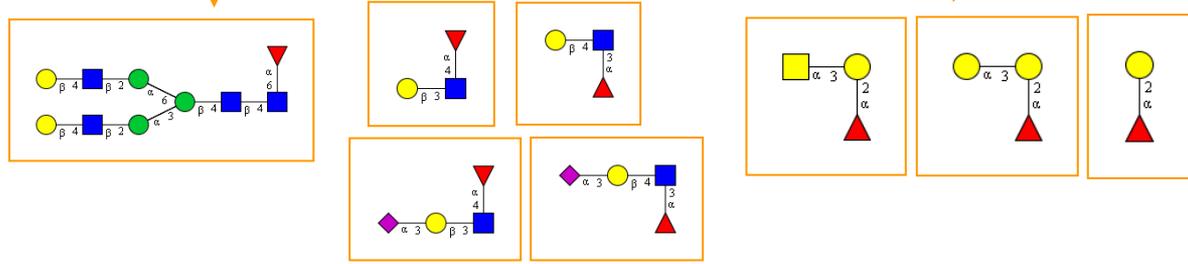
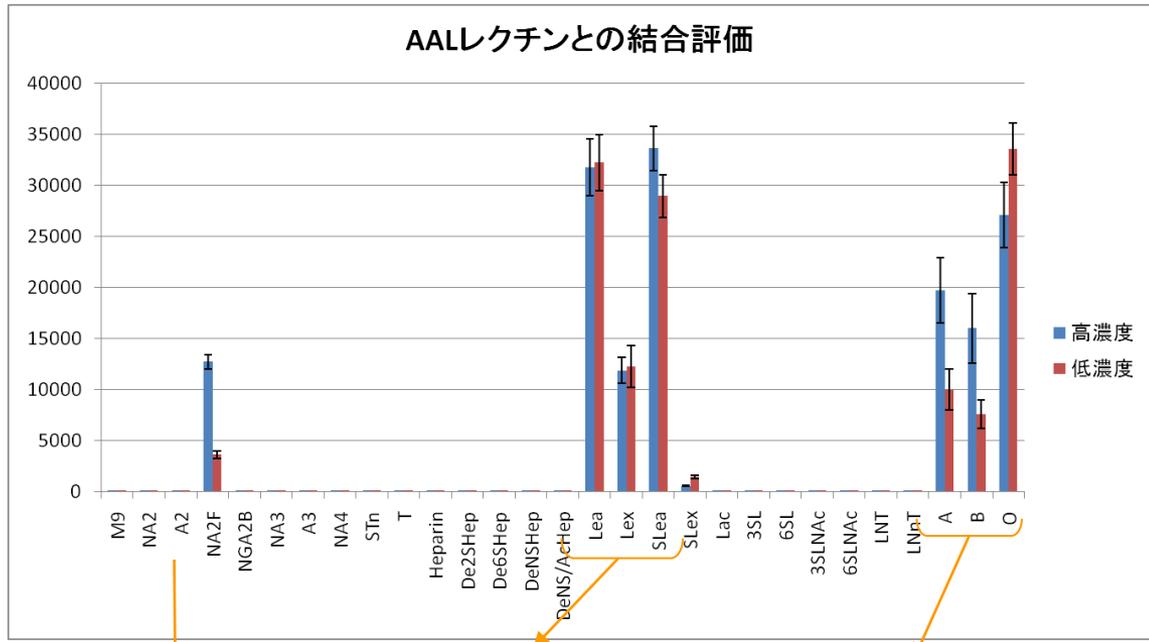
Biotin-AAL (0.5 μg/mL)
↓2h, RT
Streptavidin-Cy3 (2 μg/mL)
↓1h, RT
スキャナにて蛍光検出

糖鎖固定化アレイの使用例(レクチンとの結合)

スキャン画像



使用スキャナ: ScanArray Lite (PerkinElmer)

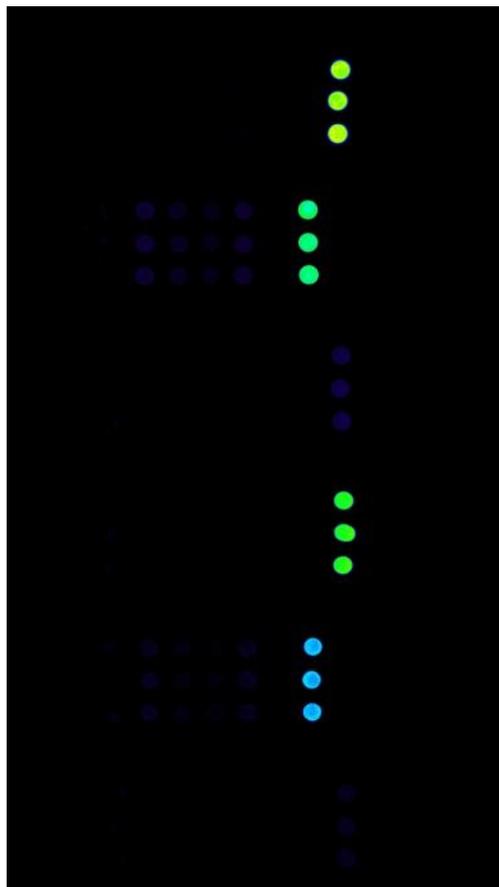


AALレクチンとフォース含有糖鎖との特異的結合を検出

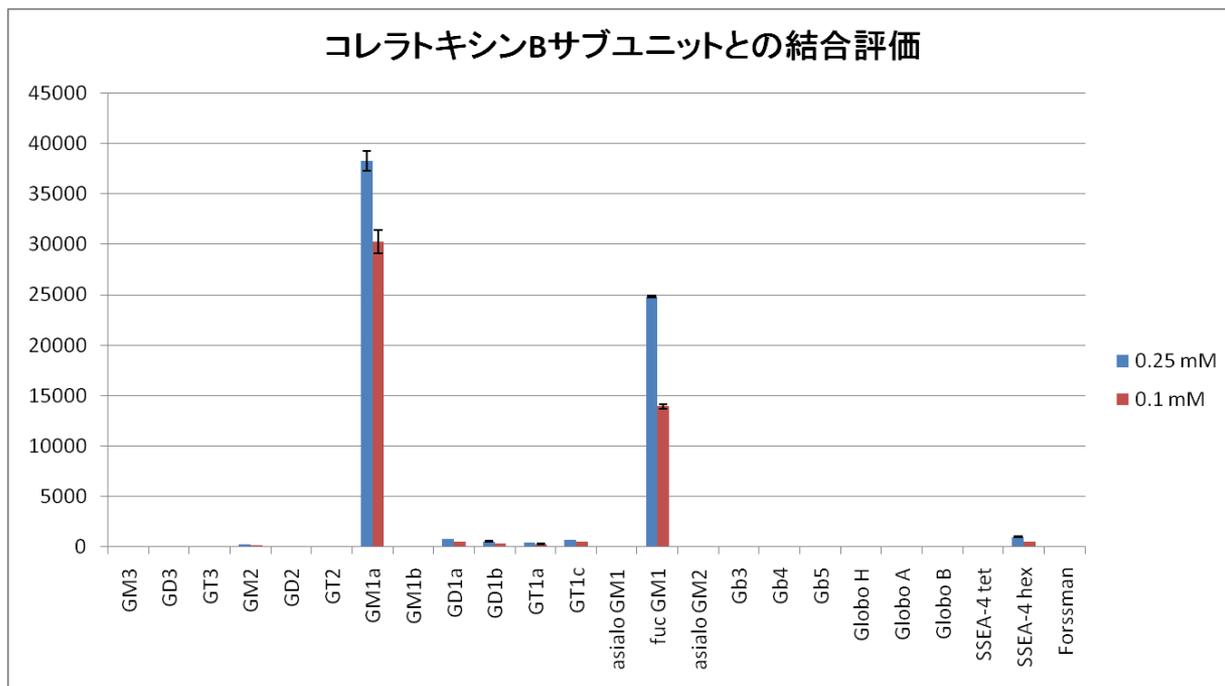
コレラトキシンBサブユニット
Alexa Fluor 555複合体
(10 µg/mL)
↓1h, RT
スキャナにて蛍光検出

糖脂質糖鎖固定化アレイの使用例(毒素との結合)

スキャン画像



使用スキャナ: ScanArray Lite (PerkinElmer)



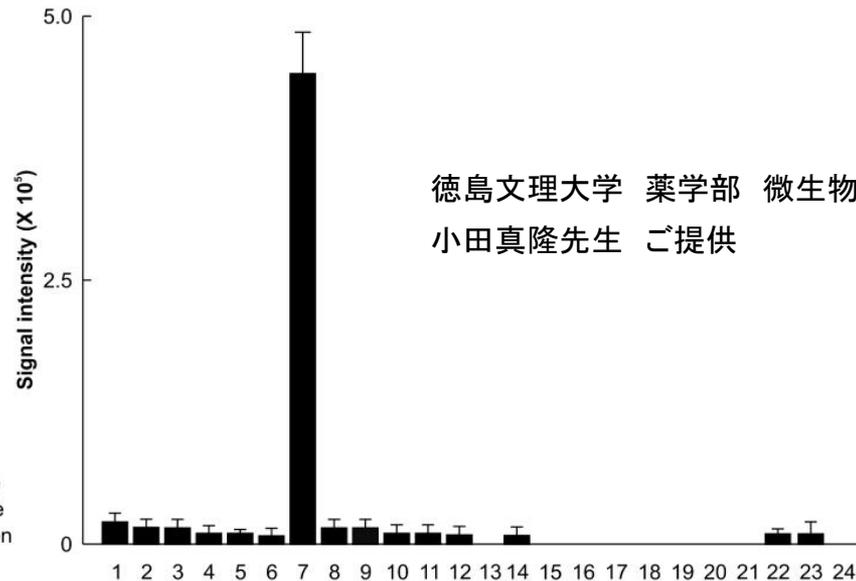
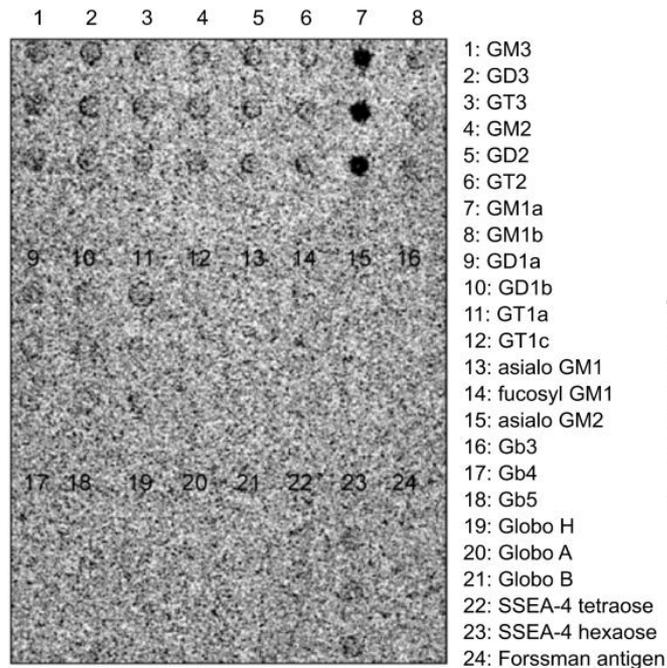
コレラトキシンBサブユニットとGM1糖鎖との特異的な結合を検出

コレラトキシンBサブユニットは、小腸上皮細胞の細胞膜表面のGM1ガングリオシドに結合することが報告されています。[1][2]

- 1) Merritt EA, et. al., *Mol. Microbiol.* **1994**, 13, 745-753
- 2) Chinnapen DJF, et. al., *FEMS Microbiol. Lett.* **2007**, 266, 129-137

糖脂質糖鎖固定化アレイの使用例2(毒素との結合)

糖脂質糖鎖固定化アレイを用いて、ウェルシュ菌が産生するα毒素の、糖脂質糖鎖との特異性を調べた。その結果、α毒素がGM1aと特異的に結合する事が確認され、細胞膜上に発現しているGM1aがα毒素のレセプターの1つとして機能している可能性が示唆された。



徳島文理大学 薬学部 微生物学教室
小田真隆先生 ご提供

(参考文献)

Oda M, Kabura M, Takagishi T, Suzue A, Tominaga K, Urano S, Nagahama M, Kobayashi K, Furukawa K, Furukawa K, Sakurai J
Clostridium perfringens alpha-toxin recognizes the GM1a/TrkA complex
J Biol Chem 287(39), 33070-33079 (2012)

まとめ

- 糖鎖に特別な化学修飾をすることなく、基板表面に様々な糖鎖を簡便に固定化可能
- タンパク質の非特異的な吸着が少なく、糖鎖の微弱な相互作用を高S/N比で検出可能
- 様々な糖鎖と生体分子との相互作用を、ハイスループットに検出可能

→ 糖鎖-タンパク質間相互作用のスクリーニングツールとして有用

➤ ターゲット分野

- ・感染症
- ・抗糖鎖抗体、レクチン研究
- ・細胞生物学、再生医療 等

➤ 拡大予定のライブラリ

- ・GAG
- ・N型、O型糖鎖(糖ペプチド) 等

カスタムアレイ作製も可能！
(スライドタイプ、96wellタイプ)

製品仕様・価格

糖鎖固定化アレイ: 28種類の糖鎖が固定化されたプラスチック製スライド
ハイブリカバー(スライド1枚につき5枚)、取扱説明書

品番	品名	数量	参考価格(税抜)	備考
BS-X1731	糖鎖固定化アレイ	1枚	¥80,000	
BS-X1732	糖鎖固定化アレイ	4枚	¥300,000	
BS-X1733	糖鎖固定化アレイ	8枚	¥560,000	

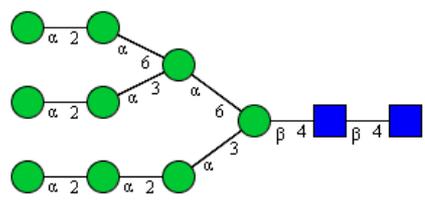
糖脂質糖鎖固定化アレイ: 24種類の糖脂質糖鎖が固定化されたプラスチック製スライド
ハイブリカバー(スライド1枚につき5枚)、取扱説明書

品番	品名	数量	参考価格(税抜)	備考
BS-X1714	糖脂質糖鎖固定化アレイ	1枚	¥80,000	
BS-X1715	糖脂質糖鎖固定化アレイ	4枚	¥300,000	
BS-X1716	糖脂質糖鎖固定化アレイ	8枚	¥560,000	

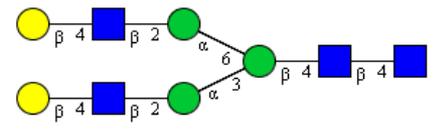
糖鎖固定化アレイ測定サービス: ユーザー様にて実験いただいたスライドを、弊社装置で測定のみ実施

品番	品名	数量	参考価格(税抜)	備考
BS-X1717	糖鎖固定化アレイ測定サービス	1枚	¥15,000	1枚だけ測定する場合の単価
BS-X1720	糖鎖固定化アレイ測定サービス	1枚	¥10,000	2枚以上測定する場合の単価

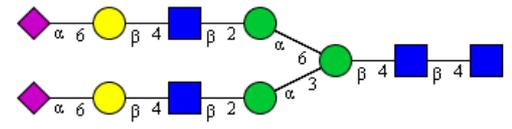
参考資料：糖鎖固定化アレイに固定化されている糖鎖の構造



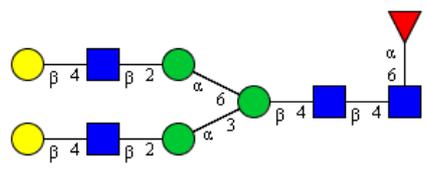
1. M9



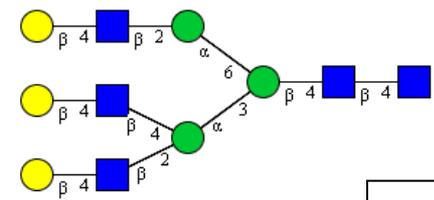
2. NA2



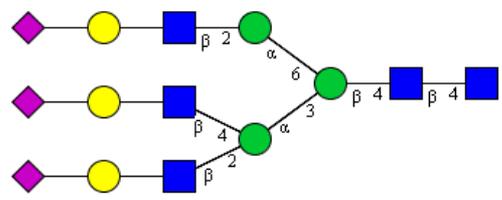
3. A2



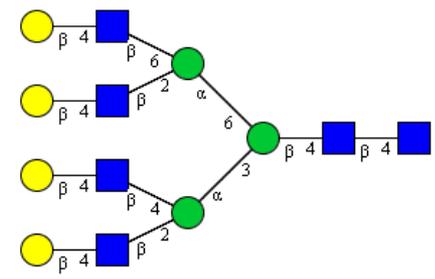
4. NA2F



5. NA3



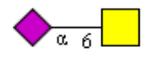
6. A3



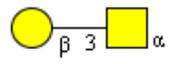
7. NA4

	: Man
	: Gal
	: Glc
	: GalNAc
	: GlcNAc
	: Neu5Ac
	: Fuc

参考資料：糖鎖固定化アレイに固定化されている糖鎖の構造



8. STn



9. T

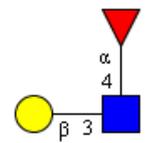
10. Heparin

11. 2-O-Desulfated Heparin

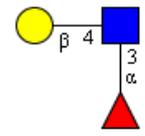
12. 6-O-Desulfated Heparin

13. N-Desulfated Heparin

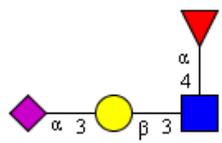
14. N-Desulfated reN-Acylated Heparin



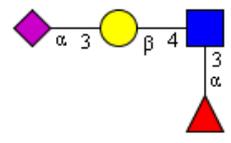
15. Le^a



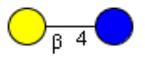
16. Le^x



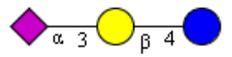
17. SLe^a



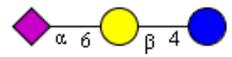
18. SLe^x



19. Lac



20. a2-3 Sialyl lactose



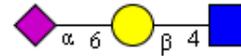
21. a2-6 Sialyl lactose

	: Man
	: Gal
	: Glc
	: GalNAc
	: GlcNAc
	: Neu5Ac
	: Fuc

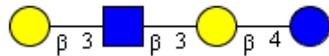
参考資料：糖鎖固定化アレイに固定化されている糖鎖の構造



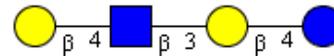
22. a2-3 Sialyl LacNAc



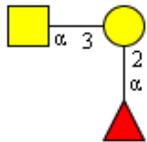
23. a2-6 Sialyl LacNAc



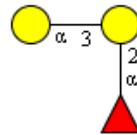
24. Lacto-N-tetraose



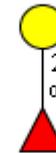
25. Lacto-N-neo-tetraose



26. A trisaccharide



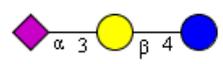
27. B trisaccharide



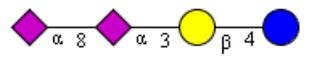
28. H(O) disaccharide

	: Man
	: Gal
	: Glc
	: GalNAc
	: GlcNAc
	: Neu5Ac
	: Fuc

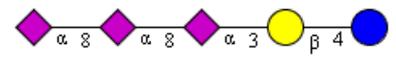
参考資料：糖脂質糖鎖固定化アレイに固定化されている糖鎖の構造



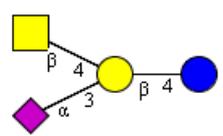
1. GM3



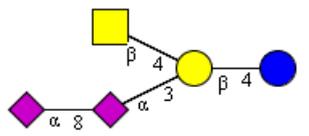
2. GD3



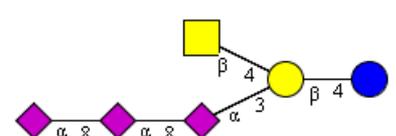
3. GT3



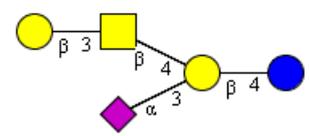
4. GM2



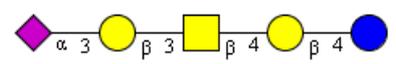
5. GD2



6. GT2



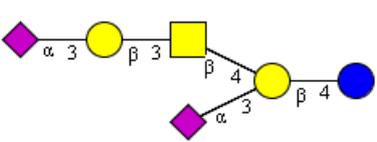
7. GM1a



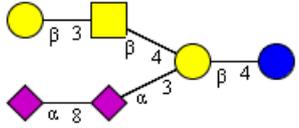
8. GM1b

	: Man
	: Gal
	: Glc
	: GalNAc
	: GlcNAc
	: Neu5Ac
	: Fuc

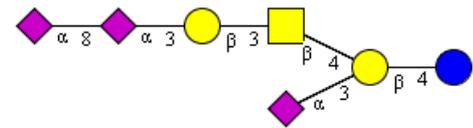
参考資料：糖脂質糖鎖固定化アレイに固定化されている糖鎖の構造



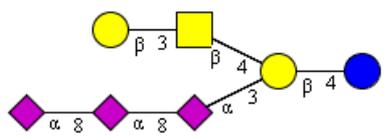
9. GD1a



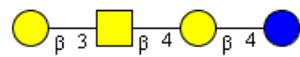
10. GD1b



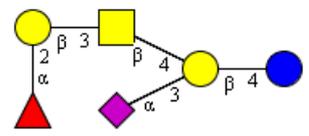
11. GT1a



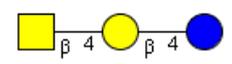
12. GT1c



13. GA1 (asialo GM1)



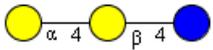
14. Fucocyl GM1



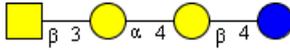
15. GA2 (asialo GM2)

	: Man
	: Gal
	: Glc
	: GalNAc
	: GlcNAc
	: Neu5Ac
	: Fuc

参考資料：糖脂質糖鎖固定化アレイに固定化されている糖鎖の構造



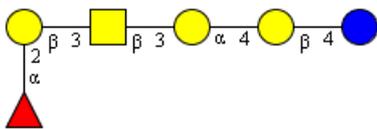
16. Gb3 (P^k antigen)



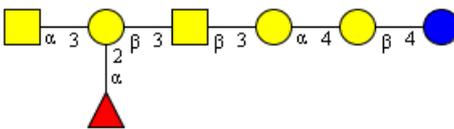
17. Gb4 (P antigen)



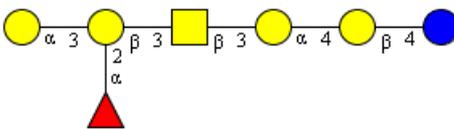
18. Gb5 (SSEA-3a)



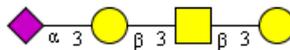
19. Globo H (SSEA-3b)



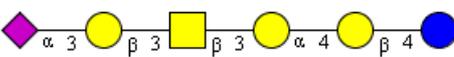
20. Globo A



21. Globo B



22. SSEA-4 tetraose



23. SSEA-4 hexaose



24. Forssman antigen

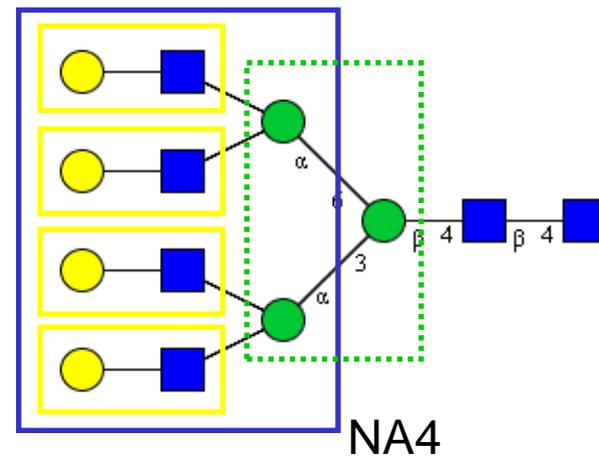
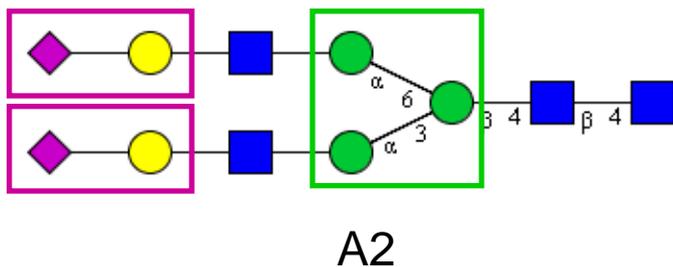
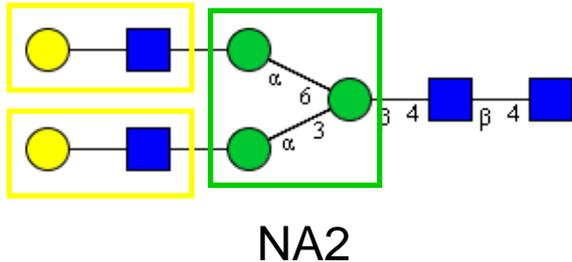
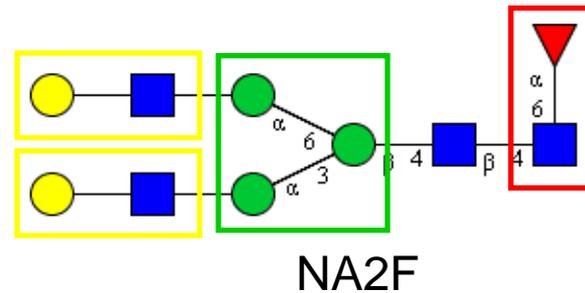
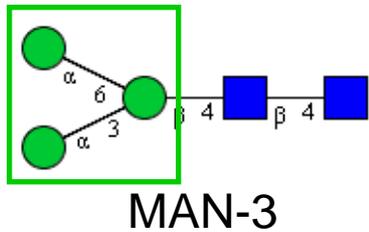
	: Man
	: Gal
	: Glc
	: GalNAc
	: GlcNAc
	: Neu5Ac
	: Fuc

カスタムアレイ作製例

1. N-Glycanとレクチンの反応特異性の確認 (96well plate type)

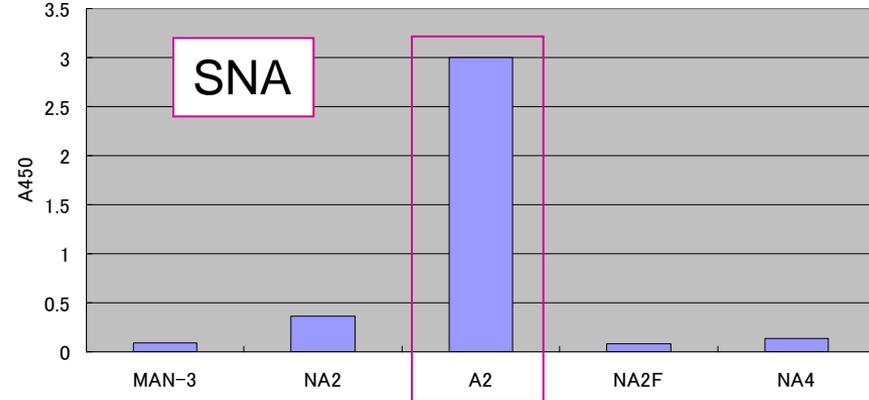
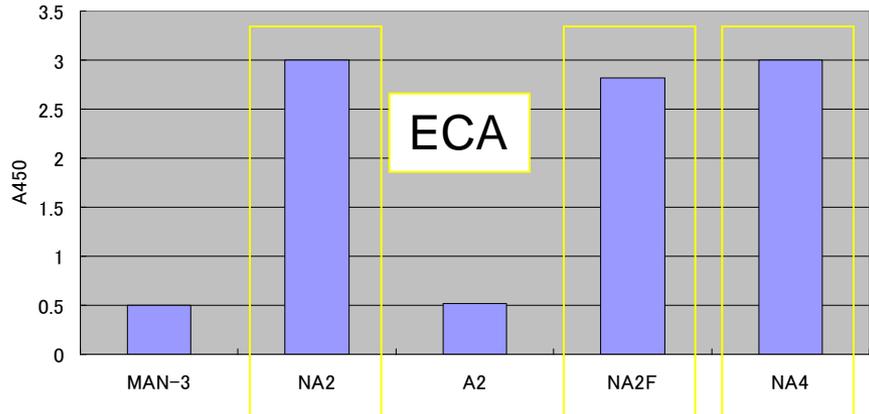
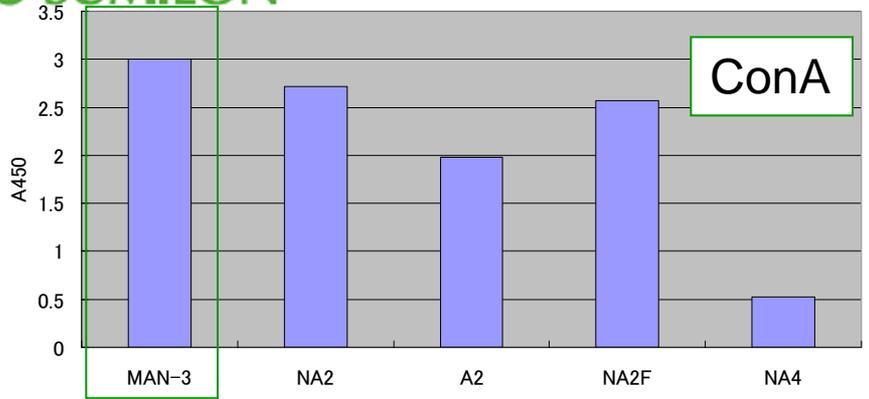
5種類のN-Glycanと5種類のレクチンを用いてそれぞれの反応性を比較し、報告されている特異性が見られるかどうか確認した

(使用レクチン: ConA、ECA、SNA、LCA、PHA-L4、各10μg/ml)

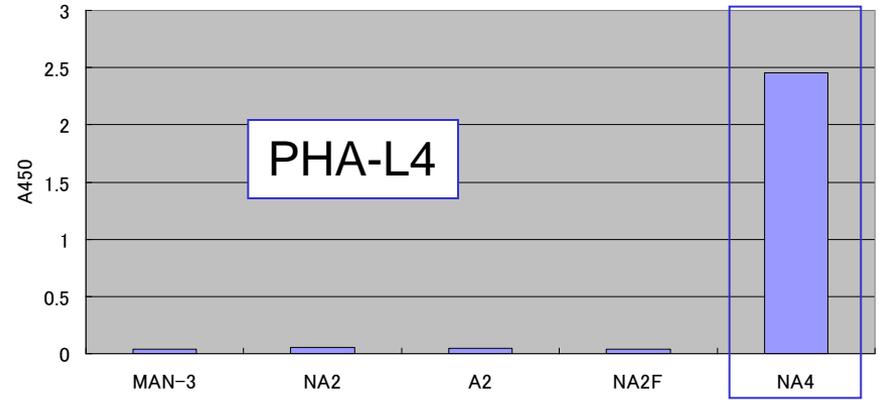
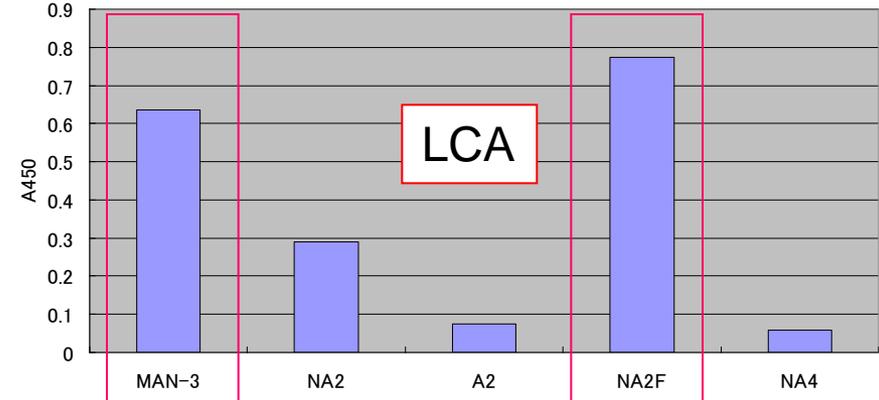


- :Man
- :Gal
- :GlcNAc
- ◆:Neu5Ac
- ▼:Fuc

N-Glycan : 10μg/mlで固定化



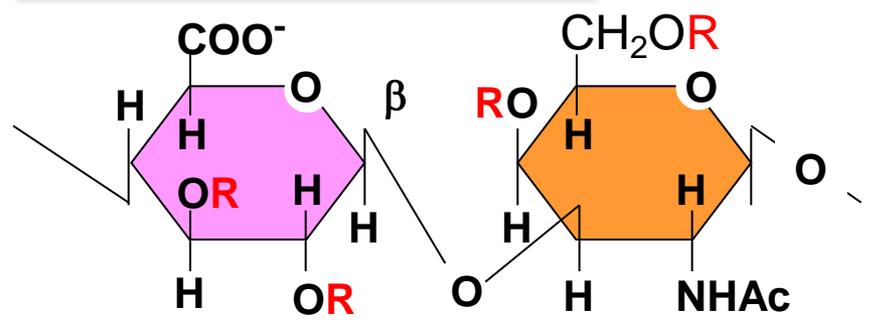
(96well plate type)



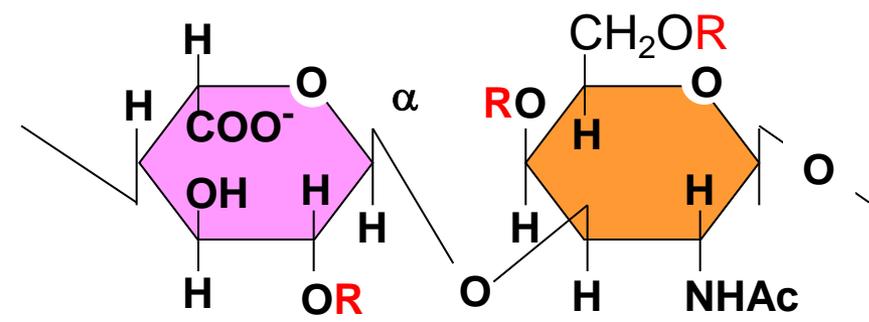
5種類全てのレクチンについて、
報告されている糖-レクチン間の
特異性を確認する事ができた。

2. Glycosaminoglycanの固定化と相互作用検出の確認

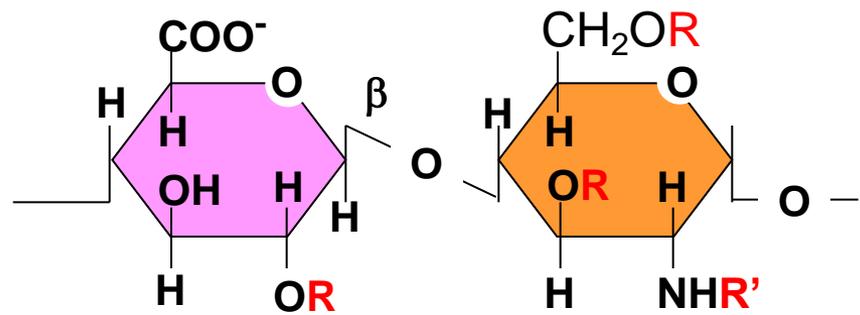
(96well plate type)



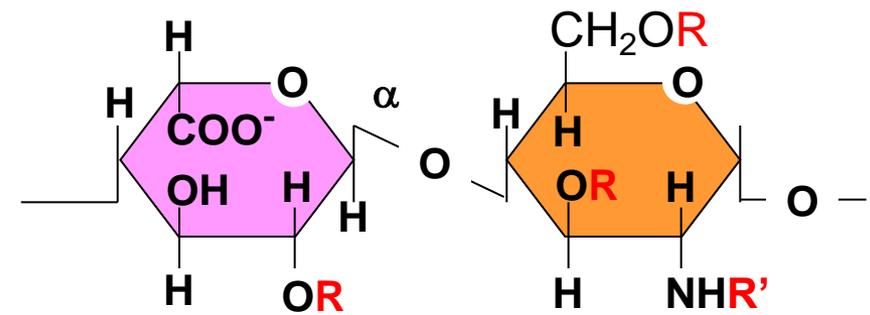
Chondroitin Sulfate(GlcA, GalNAc)



Dermatan Sulfate(IdoA, GalNAc)



Heparan Sulfate(GlcA, GlcNH₂)

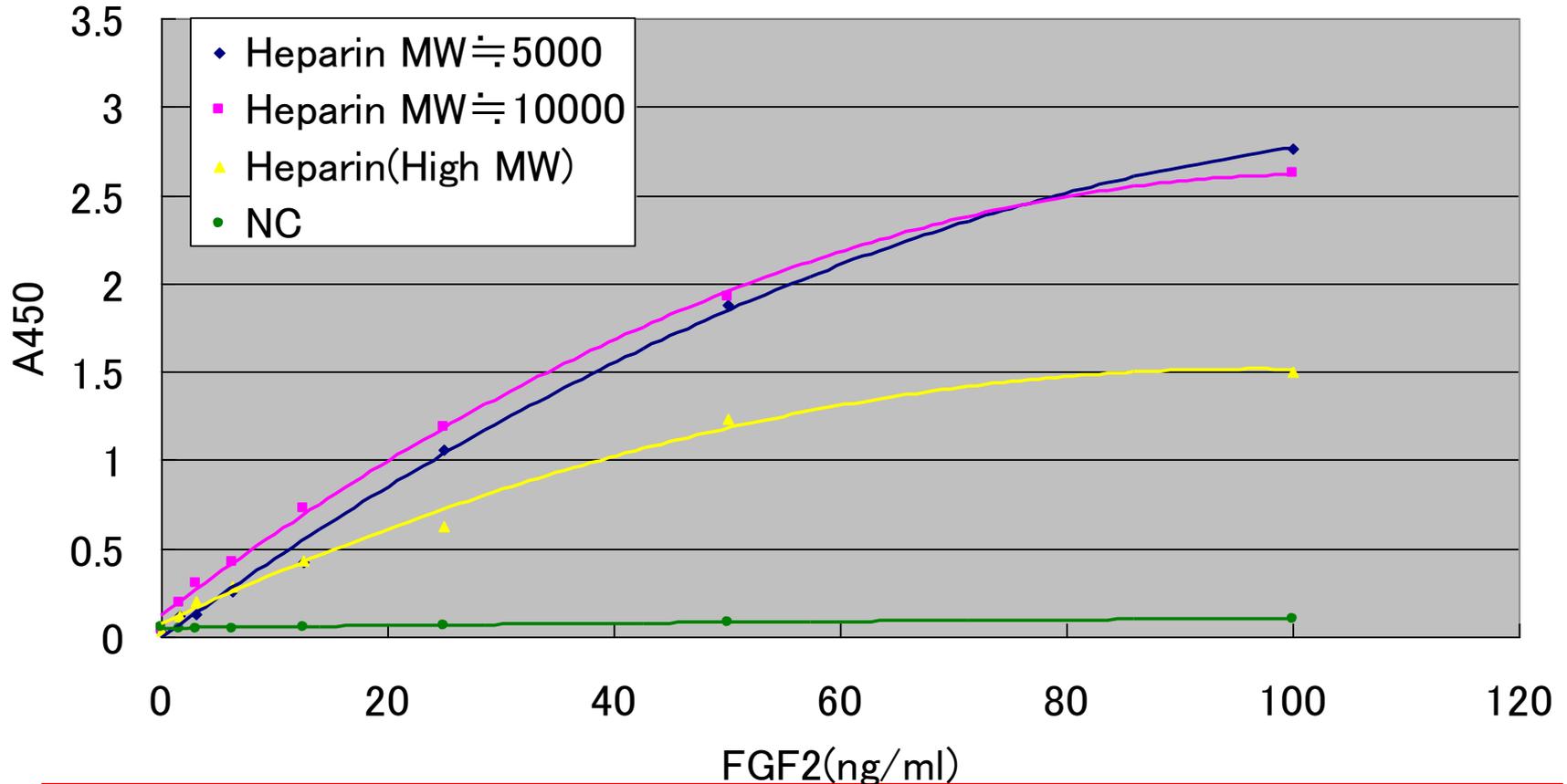


Heparin(IdoA, GlcNH₂)

R = H or SO₃⁻
R' = H or Ac or SO₃⁻

(96well plate type)

長さの異なる3種類のHeparinを固定化し、FGF2との相互作用をELISAで検出した



- ・ Glycosaminoglycanを容易に固定化可能
- ・ 固定化したGlycosaminoglycanとタンパクの相互作用を容易に検出可能

お問い合わせ先

住友ベークライト株式会社
S-バイオ事業部
マーケティング・営業部
五十嵐幸太
s-bio@sumibe.co.jp

〒140-0002 東京都品川区東品川2-5-8
TEL 03-5462-4831
FAX 03-5462-4835