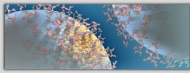


Background

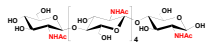


● 糖鎖:さまざまな生命現象に関与
細胞の発生・分化・接着・疾病

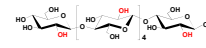
糖鎖密度は細胞による糖鎖認識に重要!!

● キチン:生理活性糖 免疫に関与

Chitin: β GlcNAc6



Cellulose: β Glc6



なぜ糖鎖6量体なのか?

● セルロース-キチンの強い分子間水素結合

→ 高密度な糖鎖基板を形成可能

● 細胞が認識できるオリゴ糖

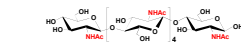
In this study

- キチン密度を制御した糖鎖基板の調製
- キチンを認識した時にのみシグナル伝達が起こる細胞を用いたCell Assayで、糖鎖と細胞の応答を定量的に測定!

固定化糖鎖基板を細胞が認識するのか?

本技術応用のためには
基板に固定化した糖鎖を
細胞が認識することが重要!

Experimental

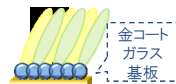


還元末端
S誘導体化

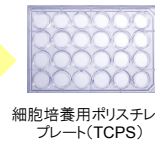


糖鎖自己組織化膜
(SAM) 調製

TSC-Au
S-Au結合



Cell Assay



糖鎖SAMをTCPSに播種

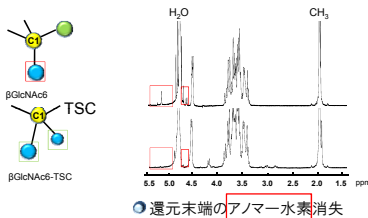
培養細胞: HEK293細胞
播種密度: 2.0×10^5 cells/well
培養環境: 37 °C, 5% CO₂

HEK293細胞

- 細胞表面にキチンを認識する
Toll-Like Receptor 2を発現
- キチン認識後TLR2シグナル伝達
→ 炎症物質放出
- シグナル伝達時に分泌されたアルカリフォスファターゼの活性を測定

Results & Discussion

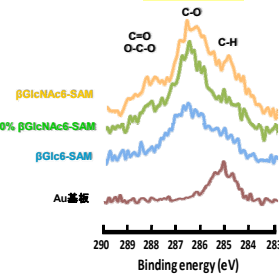
NMR



● 還元末端のアノマー水素消失

➔ 糖鎖還元末端の修飾に成功

XPS



● アセチル基由来のC=O結合を検出

➔ Au基板に糖鎖薄膜形成

● XPS測定とQCMによる糖鎖吸着量から各基板の糖鎖密度を算出

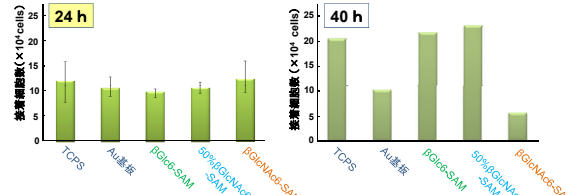
➔ 基板に糖鎖が高密度(0.6-0.8 分子/nm²)に存在

Sugar density (chain/nm²)

| Sample | Results of XPS analysis | | Results of QCM analysis* | | Sugar density (chain/nm ²) | |
|-------------------------|-------------------------|--------------------|--------------------------|-----------------------|--|------------------|
| | % β GlcNAc6-TSC | % β Glc6-TSC | ΔF (Hz) | Total weight (g) | β GlcNAc6-TSC | β Glc6-TSC |
| β GlcNAc6-SAM | 100 | 0 | -220 | 6.60×10^{-7} | 0.654 | 0 |
| 75% β GlcNAc6-SAM | 49.9 | 50.1 | -235 | 7.05×10^{-7} | 0.360 | 0.361 |
| 50% β GlcNAc6-SAM | 19.2 | 80.8 | -194 | 5.82×10^{-7} | 0.122 | 0.514 |
| 25% β GlcNAc6-SAM | 17.9 | 82.1 | -202 | 6.06×10^{-7} | 0.119 | 0.546 |
| β Glc6-SAM | 0 | 100 | -236 | 7.00×10^{-7} | 0 | 0.608 |

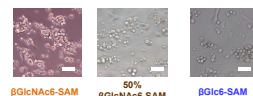
*Yoshihike et al. J. Mater. Chem., 2011

Cell Adhesion



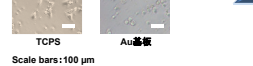
● 培養時間を延ばすほど各基板上の接着細胞数にバラツキ

24 h



● 24時間培養では接着細胞数、モルフォロジー観察結果ともに各基板による違いが小さい

40 h



➔ 基板の条件を揃えるため、培養時間は24時間に設定

Cell Response

Data not shown

● 基板により細胞炎症度に大きな変化
キチン基板でも密度の違いが影響?!

➔ 細胞が基板を認識
シグナル伝達に影響

Data not shown

● 細胞が最も認識するキチン密度が存在

➔ キチン密度の違いで
細胞炎症度に大きな変化

Conclusion

- 細胞: 固定化糖鎖基板を直接認識!
- 基板: 細胞のシグナル伝達に影響!
- 糖鎖密度: シグナル伝達に強く関与!

細胞表面タンパク質が
固定化糖鎖の密度を認識!!

基板の糖鎖密度デザインにより
細胞応答を操作可能な
新規スキャフォールドの開拓へ!