「糖鎖の生物機能の解明と利用技術」
平成16年度採択研究代表者

木下　タロウ

（大阪大学微生物病研究所　教授）

「糖鎖の動態-機能相関への統合的アプローチ」

１．研究実施の概要

糖鎖の機能研究の多くは、生合成が完了した形態のものを対象として行われ、様々な重要な生物学的機能が明らかになり、糖鎖の構造との関係についても解明が進みつつある。本研究課題では、糖鎖の生合成の過程と、分解に至るプロセッシングの過程でも重要な生物機能が発現することに注目し、生合成から分解への全行程における、糖鎖の構造と局在部位の変化と、生物機能発現の相関を統合的に研究している。糖鎖の動態を変化の時間的流れに沿って、「糖鎖生合成時の動態」、「糖鎖の膜上動態」、「糖鎖プロセッシングの動態」の３つの相に分けてとらえ、各相における機能との相関をとらえようとしている。対象として、GPI アンカー、N-グリカン、O-グリカン、グリコサミノグリカンを取り上げ、生合成時、膜上、プロセッシング時の動態を支配する構造的、細胞生物学的基盤を解明し、さらに病態解明への展開を図りつつある。今年度においては、本チーム内の研究グループ間の共同研究により、１）膜上動態の重要な現象である脂質ラフトへのGPI アンカー型タンパク質の濃縮過程に必須な因子PGAP2 の発見、２）前立腺癌の診断に重要なPSA の糖鎖構造の解明、３）N-グリカンのフコース転移酵素の欠損マウスが肺気腫を起こすことの発見といった重要な進展があった。

２．研究実施内容

木下タロウグループ

GPI アンカー型タンパク質は、細胞膜上において脂質ラフトに濃縮され、他のラフト構成成分と相互作用しつつ、細胞内外の情報のやりとりなどの機能発現に関与する。GPI アンカー型タンパク質が脂質ラフトに濃縮されるのは、PI の脂肪鎖が２本とも飽和型であり、それによってスフィンゴ糖脂質やコレステロールが作る liquid ordered phase に安定に存在できるからだと言われてきた。今年度の研究で、その構造がGPI アンカーの脂質リモデリングによって形成されること、リモデリングにはゴルジ体の新規膜タンパク質PGAP2 が必要であること、リモデリングが起こらないとGPI アンカー型タンパク質は脂質ラフトに濃縮されないことを明らかにした。

GPI アンカー生合成の第１ステップに働くGPI-N-アセチルグルコサミン転移酵素の新規成分であるPIG-Y をクローニングし、この酵素が、単糖転移酵素としては極めて特異な、７成分からなる複

合体であることを示した

池田義孝グループ

アスパラギン結合型糖鎖のコア構造形成に関与する N-アセチルグルコサミン転移酵素 III（GnT-III）の活性制御機構の解析を行った。無機ピロリン酸による酵素活性阻害では、ピロリン酸結合によるコンフォメーション変化を伴うことが内因性トリプトファン蛍光の変化によって追跡することができた。また、そのコンフォメーション変化には、協同性のない成分と強い協同性をもつ成分二つからなっていることがわかり、ピロリン酸の結合部位として区別出来る複数が存在することが示唆された。前者の成分は弱い活性化に関与し、後者の成分は不活性型への変換に相当すると考えられ、この二つによってピロリン酸による協同的な阻害が見かけ上非常に強くなるものと考えられた。一方、糖鎖構造によるタンパク質機能の制御については、上皮増殖因子（EGF）受容体に注目し、この糖鎖構造を GnT-III 遺伝子の導入により改変した細胞を用いて細胞内シグナル伝達およびリガンド結合能への影響を解析している。現在のところ、リガンド結合に関して on-rate および off-rate の両者が同程度低下しているという結果を得ており、この変化によって自己リン酸化から引き続く細胞内での諸反応が影響を受けていると考えている。さらに解析を進め、糖鎖構造の変化が受容体タンパク質の性質をどのように変化させるか明らかにしたいと考えている。

大山　力グループ

1.　前立腺特異抗原（PSA）の糖鎖構造解析

前立腺特異抗原（PSA）は糖蛋白であり、N 結合型糖鎖が一ケ所存在する。PSA の糖鎖構造の癌性変異を検出するために、まず seminal fluid 由来の PSA 糖鎖の詳細な構造解析を行い、前立腺癌に特異的な PSA の糖鎖構造の変異を検出するレクチンの同定を行った。さらに詳細に前立腺癌特異的な糖鎖構造について検討したところ、PSA の糖鎖構造は従来同定された構造のみならず、非常に多様性に富んでいることが明らかになった。Stamey らのグループは 2 本鎖で末端にはシアル酸が α2-6 でガラクトースに結合した *N*-glycan のみが発現していると報告したが、我々の検討では、計 19 種類の構造が同定された。しかも、末端のシアル酸は α2-6 のみでなく α2-3 でガラクトースに結合しているものも約 10%存在することが明らかになった。さらに、Sialic acid alpha 2,3 Gal-GlcNAc が癌に多く発現していることが明らかになった。そこで Sialic acid alpha 2,3 Gal-GlcNAc を免疫原として同構造を認識するモノクローナル抗体の作成を開始した。

2.　α-galactosylceramide の NKT 細胞活性化作用を利用した尿路感染症治療法に関する研究

マウス尿路感染症モデルにおいて α-galactosylceramide が優れた抗菌効果を有することを明らかにした。

3.　泌尿器癌における糖転移酵素の遺伝子多型

前立腺肥大症と前立腺癌の症例における Core2GnT の SNP について検討したところ、codon 152 *A/G* 多型と前立腺癌発症の関連が明らかになった。

顧　建国グループ

細胞に発現する糖鎖構造は糖転移酵素、糖鎖分解酵素などの糖鎖合成関連遺伝子（糖鎖遺伝子）の発現パターンにより決定される。これらの遺伝子をもちいて、糖鎖リモデリング、そしてグライコミクスの手法によって糖鎖の生理機能、癌転移への影響、疾患との関連などが明らかとなりつつある。これまでの研究から、α1,6 フコースは多くの糖蛋白質の機能制御に大きく関わることが予想されているが、このα1,6 フコースの生理的な機能や標的糖タンパク質への機能制御に関しては、ほとんど不明である。最近、著者らはFut8 のノックアウトマウスの作成に成功した。この変異マウスは生後早い時期に死亡してしまい、α1,6 フコースが成長発育に必須であることが判明した。TGF-β受容体にこのα1,6 フコース糖鎖が付加されないと、受容体とリガンドである TGF-β との結合性が低下し、TGF-β受容体を介してマトリックスメタロプロテアーゼの発現抑制が解除される。それによって、肺組織の細胞外マトリックス生合成と分解の均衡が破れ、分解酵素が多量に作られ、肺組織が壊れて肺気腫になることをマウスの実験で確認した。またこの欠損マウスはこの TGF-β を大量に投用することにより肺気腫が改善することも確かめた。一方、細胞増殖と深く関わる EGF 受容体にはこのフコースを欠損すると、EGF からのシグナルをうまく伝達されなくなることを Fut8 のノックアウトマウスまたは細胞で確認された。

近藤　玄グループ

アンギオテンシン変換酵素(ACE)の GPI アンカー型タンパク質遊離活性を生体レベルで解析するため、ペプチダーゼ欠損 ACE Tg マウスを系統化し、各臓器でのトランスジーンの発現を調べたところ、精巣での発現と受精異常に相関関係がみられた。また、これらの Tg マウスの尾動脈で血圧測定したところ, 血圧低下は野生型 ACE 導入 Tg マウスでは認められず欠損型 ACE 導入 Tg マウスに特徴的であった。

菅原一幸グループ

(1) ハエでのヘパラン硫酸合成における３つの *EXT* ファミリーメンバーの３つの遺伝子を異なる組み合わせで共発現させ、合成産物を生化学的に解析し、３つの遺伝子産物がそれぞれ必須の固有の機能を有することを証明した。（２）胎児脳由来の、神経突起伸長促進活性をもつコンドロイチン硫酸・デルマタン硫酸ハイブリッド鎖から、その活性を担うプレイオトロフィン結合ドメイン八糖をプレイオトロフィン固定化カラムを用いて単離し、構造を決定した。（３）ホヤから単離した高硫酸化デルマタン硫酸を免疫源として、世界に先駆けて抗デルマタン硫酸単クローン抗体を作成し、海馬と小脳を特異的に染色することを示し、多糖を酵素で限定分解後に最小サイズを十糖と決定し、陰イオン交換クロマトでエピトープ十糖を単離精製し、構造を決定した。（４）ヘルペス単純ウイルス-1 の哺乳動物細胞への感染をイカ軟骨のコンドロイチン硫酸 E が強く阻害することを見出し、さらに宿主細胞のコンドロイチン硫酸にも E 二糖構造が存在しレセプターとして機能していることを証明し、ウイルス表面糖タンパク質 C の結合サイトの最小構造を八糖と決定した。（５）マウスの *EXTL2* を破壊したキメラマウスを作成し、フェノタイプを解析中である。ゼブラフィッシ

ュの系でコンドロイチン 4-*O*-硫酸基転移酵素遺伝子のモルフォリノオリゴヌクレオチドを用いて、コンドロイチン硫酸合成を遺伝子撹乱し、フェノタイプを解析中である。（７）コンドロイチン硫酸を分解する新規酵素を検索中である。

鈴木　匡グループ

真核細胞の細胞質に広く遊離のＮ型糖鎖が蓄積、プロセスされる現象は古くから知られている。そのプロセシングの順序として主に(1)糖タンパク質からの糖鎖の脱離（PNGase）(2)糖鎖の還元末端の GlcNAc 残基の脱離（ENGase）そして(3)非還元末端の Man 残基の脱離（α-マンノシダーゼ）の３段階で行われることが示唆されている。平成 17 年度はα-マンノシダーゼの遺伝子を同定し、その阻害が遊離糖鎖の蓄積をもたらすことを明らかにした。更に糖鎖の簡便解析法の確立のため、種々遊離糖鎖のスタンダードの調製を行った。また、PNGase の ERAD における機能の解析も行った。

田口友彦グループ

ゴルジ体から細胞膜へ向けての分泌経路（エキソサイトーシス）において、直接タンパク質がゴルジ体を脱出後細胞膜へと到着するという古典的な考え方が最近になって再考を迫られている。我々は以前に実はゴルジ体の近傍に存在しているリサイクリングエンドソームという細胞小器官が分泌経路における key player であることを示し、本 CREST 研究ではその細胞小器官の機能を分子レベルで説明すべく研究を行っている。本年度においては、リサイクリングエンドソームに局在する可能性のあるタンパク質(rab family)を種々同定することに成功し、また生化学的単離に関する基礎手法を確立することができた。また、細胞膜から小胞体へ至る逆行輸送においてもリサイクリングエンドソームの機能が必要であることを示すことができた。

田口　良グループ

木下グループとの共同で GPI アンカータンパク質合成変異体の一つにおいて、ホスホリパーゼ D 様の酵素作用により生じる GPI アンカーC 末端ペプチドの微細構造を質量分析により解明した。さらに、ＧＰＩアンカー野生株と GPI 合成２重変異株の PI 分子種の質量分析により PI の *sn-2* 位の脂肪酸のリモデリング過程の存在を明らかにした。

和田芳直グループ

我々が開発した糖タンパク質部位特異的糖鎖構造解析法のパフォーマンスを実証するためにフィブロネクチンの血漿型・細胞型アイソフォームにおける７箇所のＮ型糖鎖構造の違い、および、分子量５５万のアポリポ蛋白 B100 の１８箇所の糖鎖構造を解析した。これらの糖タンパク質を酵素消化ののち、前年度に開発した方法によって糖ペプチドを濃縮し、質量分析法により解析した。前者においては２つのアイソフォーム間でフコース付加に違いがあり、糖鎖付加部位によってさらにそれらが異なっていることがわかった。また、新規の０型糖鎖付加部位を発見し、論文に発表した。すなわち、この方法が０型糖鎖の解析にも有用であることが証明されたことで、研究の遅れている

O 型糖鎖に関しての今後の研究展望を開くことができた。また、大山グループの課題である前立腺特異抗原 PSA の糖鎖構造に対して共同研究を行い、新たな知見を得た。一方、先天性糖鎖合成異常症 CDG の分子診断を確立するためにも、上記の方法が有用であり、特に、患者の発見が難しい CDG-II 型について、診断戦略を構築した

３．研究実施体制

「木下タロウ」グループ

①研究分担グループ長：木下タロウ（大阪大学微生物病研究所、教授）

②研究項目：

(1) GPI アンカー型タンパク質の生合成時の動態の解明

(2) GPI アンカー型タンパク質の脂質ラフトへの組み込みメカニズムの解明

「池田義孝」グループ

①研究分担グループ長：池田　義孝（佐賀大学・医、教授）

②研究項目：アスパラギン結合型糖鎖のアセンブリと多様性の制御機構

「大山　力」グループ

①研究分担グループ長：大山　　力（弘前大学、教授）

②研究項目：

1.前立腺特異抗原（PSA)の糖鎖構造解析

2.α-galactosylceramideのNKT細胞活性化作用を利用した尿路感染症治療法に関する研究

3.前立腺癌におけるCore2GnTの遺伝子多型

「顧　建国」グループ

①研究分担グループ長：顧　建国（大阪大学、助教授）

②研究項目：*N*-結合型糖鎖による細胞膜受容体の機能制御とそのメカニズムの解析

「近藤　玄」グループ

①研究分担グループ長：近藤　玄（京都大学、助教授）

②研究項目：糖鎖プロセッシングの動態と機能発現

「菅原一幸」グループ

①研究分担グループ長：菅原　一幸（神戸薬科大学、教授）

②研究項目：

1. マウスの遺伝子撹乱による糖鎖機能解析

2. ゼブラフィッシュの遺伝子撹乱による糖鎖機能解析

3. 神経系での糖鎖撹乱と機能解析
4. 脳の糖鎖の構造・機能解析
5. 糖鎖抗体エピトープの解析
6. ウイルス感染における糖鎖機能解析
7. コンドロイチン硫酸を分解する新規酵素の検索

「鈴木　匡」グループ
①研究分担グループ長：鈴木　匡（大阪大学医学部、特任助教授）
②研究項目：細胞質における遊離糖鎖のプロセシング機構とその生物学的重要性

「田口友彦」グループ
①研究分担グループ長：田口　友彦（大阪大学、特任助教授）
②研究項目：リサイクリングエンドソームの構造と機能の解明
新規な膜輸送小胞の単離法の開発と応用

「田口　良」グループ
①研究分担グループ長：田口　良（東京大学、客員教授）
②研究項目：質量分析法による GPI アンカーの詳細構造決定システムの動態理解への応用

「和田　芳直」グループ
①研究分担グループ長：和田　芳直（大阪府立母子保健総合医療センター研究所、研究所長）
②研究項目：部位特異的な糖鎖構造解析と糖鎖合成疾患解析への応用

４．主な研究成果の発表（論文発表および特許出願）

（１）　論文（原著論文）発表

○ Hong, Yeongjin, J. Y. Kang, Y. U. Kim, D.-J. Shin, H. E. Choy, Y. Maeda, and T. Kinoshita. 2005. New mutant Chinese hamster ovary cell representing an unknown gene for attachment of glycosylphosphatidylinositol to proteins. *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, 335:1060-1069.

○ Murakami, Y, U. Siripanyaphinyo, Y. Hong, Y. Tashima, Y. Maeda, T. Kinoshita. 2005. The Initial Enzyme for Glycosylphosphatidylinositol Biosynthesis Requires PIG-Y, a Seventh Component. *Mol. Biol. Cell.* 16:5236-5246.

○ Ashida, H., Y. Maeda and T. Kinoshita. 2006. DPM1, the catalytic subunit of dolichol-phosphate-mannose synthase, is tethered to and stabilized on the endoplasmic reticulum membrane by DPM3. *J. Biol. Chem.*, 281, 896-906.

○ Hong, Yeonchul, K. Nagamune, K. Ohishi, Y. S. Morita, H. Ashida, Y. Maeda and T. Kinoshita. 2006. TbGPI16 is an essential component of GPI transamidase in *Trypanosoma brucei*. *FEBS Let.*, .,

580:603-606.

○ Hong, Yeonchul, K. Nagamune, Y. S. Morita, F. Nakatani, H. Ashida, Y. Maeda and T. Kinoshita. 2006. Removal or maintenance of inositol-linked acyl chain in GPI is critical in trypanosome life cycle. *J. Biol. Chem.*, in press.

○ Ikeda Y, Taniguchi N (2005) Gene expression of gamma-glutamyltranspeptidase. *Methods Enzymol.* 401, 408-425.

○ Ihara H, Ikeda Y, Taniguchi N. (2006) Reaction mechanism and substrate specificity for nucleotide sugar of mammalian {alpha}1,6-fucosyltransferase—a large-scale preparation and characterization of recombinant human FUT8. *Glycobiology*. 16, 333-342.

○ Wang X, Inoue S, Gu J, Miyoshi E, Noda K, Li W, Mizuno-Horikawa Y, Nakano M, Asahi M, Takahashi M, Uozumi N, Ihara S, Lee SH, Ikeda Y, Yamaguchi Y, Aze Y, Tomiyama Y, Fujii J, Suzuki K, Kondo A, Shapiro SD, Lopez-Otin C, Kuwaki T, Okabe M, Honke K, Taniguchi N. (2005) Dysregulation of TGF-beta1 receptor activation leads to abnormal lung development and emphysema-like phenotype in core fucose-deficient mice. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 102, 15791-15796.

○ Ishii T, Matsuki S, Iuchi Y, Okada F, Toyosaki S, Tomita Y, Ikeda Y, Fujii J. (2005) Accelerated impairment of spermatogenic cells in SOD1-knockout mice under heat stress. *Free Radic Res*. 39, 697-705.

○ Eguchi H, Ikeda Y, Ookawara T, Koyota S, Fujiwara N, Honke K, Wang PG, Taniguchi N, Suzuki K. (2005) Modification of oligosaccharides by reactive oxygen species decreases sialyl lewis x-mediated cell adhesion. *Glycobiology.* 15, 1094-1101.

○ Otsu K, Sato K, Ikeda Y, Imai H, Nakagawa Y, Ohba Y, Fujii J. (2005) An abortive apoptotic pathway induced by singlet oxygen is due to the suppression of caspase activation. *Biochem J.* 389, 197-206.

○ Hagisawa S, Ohyama C, Takahashi T, Endoh M, Moriya T, Nakayama J, Arai Y, Fukuda M. Expression of Core 2 {beta}1,6-N-acetylglucosaminyltransferase Facilitates Prostate Cancer Progression. *Glycobiology,* 15:1016-1024,2005.

○ Wang L, Mitoma J, Tsuchiya N, Narita S, Horikawa Y, Habuchi T, Imai A, Ishimura H, Ohyama C, Fukuda M. An A/G polymorphism of core 2 branching enzyme gene is associated with prostate cancer. *Biochem Biophys Res Commun*, 331:958-63,2005.

○ Minagawa S, Ohyama C, Hatakeyama S, Tsuchiya N, Kato T, Habuchi T. Activation of natural killer T cells by alpha-galactosylceramide mediates clearance of bacteria in murine urinary tract infection. *J Urol,* 173:2171-4,2005.

○ Satoh M, Ito A, Kaiho Y, Nakagawa H, Saito S, Endo M, Ohyama C, Arai Y. Intraoperative, radio-guided sentinel lymph node mapping in laparoscopic lymph node dissection for Stage I testicular carcinoma. *Cancer*, 103: 2067-72,2005.

○ Wang X, Gu J, Ihara H, Miyoshi E, Honke K, Taniguchi N. Core fucosylation regulates EGF receptor-mediated intracellular signaling. *J Biol Chem.* 281:2572-7, 2006.

○ Okuyama N, Ide Y, Nakano M, Nakagawa T, Yamanaka K, Moriwaki K, Murata K, Ohigashi H, Yokoyama S, Eguchi H, Ishikawa O, Ito T, Kato M, Kasahara A, Kawano S, Gu J, Taniguchi N, and Miyoshi E Fucosylated haptoglobin is a novel marker for pancreatic cancer: A detailed analysis of the oligosaccharide structure and a possible mechanism for fucosylation.. *Int. J. Cancer* in press

○ Inamori, K., Mita, S., Gu, J., Mizuno-Horikawa, Y., Miyoshi, E., Dennis, JW., and Taniguchi, N. Demonstration of the expression and the enzymatic activity of *N*-acetylglucosaminyltransferase IX in the mouse brain. *Biochim Biophys Acta* in press.

○ Inamori, K., Gu, J., Ohira, M., Kawasaki, A., Nakamura, Y., Nakagawa, T., Kondo, A., Miyoshi, E., Nakagawara, A., and Taniguchi, N. High expression of *N*-acetylglucosaminyltransferase V in favorable neuroblastomas: Involvement of its effect on apoptosis *FEBS Letters*, 580:627-32, 2006

○ Ide Y, Miyoshi E, Nakagawa T, Gu J, Tanemura M, Nishida T, Ito T, Yamamoto H, Kozutsumi Y and Taniguchi N. Aberrant expression of N-Acetylglucosaminyltransferase-IVa and IVb (GnT-IVa and b) in pancreatic cancer. *BBRC* in press.

○ Izumikawa, T., Egusa, N., Taniguchi, F., Sugahara, K., and Kitagawa, H. (2006) Heparan sulfate polymerization in Drosophila. *J. Biol. Chem.*, 281(4), 1929-1934.

○ Bao, X., Muramatsu, T., and Sugahara, K. (2005) Demonstration of the pleiotrophin-binding oligosaccharide sequences isolated from chondroitin sulfate/dermatan sulfate hybrid chains of embryonic pig brains. *J. Biol. Chem.*, 280(42), 35318-35328.

○ Bergefall, K., Trybala, E., Johansson, M., Uyama, T., Naito, S., Yamada, S., Kitagawa, H., Sugahara, K., and Bergstrom, T. (2005) Chondroitin sulfate characterized by the E disaccharide unit is a potent inhibitor of herpes simplex virus infectivity and provides the virus binding sites on gro2c cells. *J. Biol. Chem.*, 280(37), 32193-32199.

○ Bao, X., Pavao, M. S., Dos Santos, J. C., and Sugahara, K. (2005) A functional dermatan sulfate epitope containing Iduronate(2-O- sulfate)alpha1-3GalNAc(6-O-sulfate) disaccharide in the mouse brain: Demonstration using a novel monoclonal antibody raised against dermatan sulfate of Ascidian ascidia nigra. *J. Biol. Chem.,* 280(24), 23184-23193.

○ Ito, Y., Hikino, M., Yajima, Y., Mikami, T., Sirko, L., von Holst, A., Faissner, A., Fukui, S., and Sugahara, K. (2005) Structural characterization of the epitopes of the monoclonal antibodies 473HD, CS-56 and MO-225 specific for chondroitin sulfate D-type using the oligosaccharide library. *Glycobiology*, 15(6), 593-603.

○ Kim, I., Ahn, J., Liu, C., Tanabe, K., Apodaca, J., Suzuki, T., and Rao, H. (2006). The Png1-Rad23 complex regulates glycoprotein turnover. *J. Cell Biol.* 172, 211-219.

○ Toshiaki Houjou, Kotoko Yamatani, Masayoshi Imagawa, Takao Shimizu, Ryo Taguchi. A Shotgun tandem mass spectrometric analysis of phospholipids with normal-phase and/or reverse-phase liquid

chromatography/electrospray ionization mss spectrometry.: **Rapid Commun. Mass Spectrom.,** 19, 654-666 (2005)

○ Taguchi R, Houjou T, Nakanishi H, Yamazaki T, Ishida M, Imagawa M, Shimizu T. Focused lipidomics by tandem mass spectrometry.: *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci.* 25;823(1):26-36. 2005.

○ Tashima Y, Taguchi R, Murata C, Ashida H, Kinoshita T, Maeda Y.: PGAP2 Is Essential for Correct Processing and Stable Expression of GPI-anchored Proteins., *Mol Biol Cell.* 2006 Mar;17(3):1410-20

○ Tajiri M, Yoshida S, Wada Y. "Differential analysis of site-specific glycans on plasma and cellular fibronectins: Application of a hydrophilic affinity method for glycopeptide enrichment." *Glycobiology* 15, 1332-1340 (2005)

○ Yoshida S, Wada Y. "Transfer of maternal cholesterol to embryo and fetus in pregnant mice" *J Lipid Res.* 46, 2168-2174 (2005)

○ Okuno S, Arakawa R, Okamoto K, Matsui Y, Seki S, Kozawa T, Tagawa S, Wada Y. "Requirements for laser-induced desorption/ionization on submicrometer structures." *Anal Chem* 77, 5364-5369 (2005)

○ Sekiya S, Wada Y, Tanaka K. "Derivatization for stabilizing sialic acids in MALDI-MS" *Anal Chem* 77, 4962-4968 (2005)

○ Okuno S, Wada Y. "Measurement of serum salicylate levels by solid-phase extraction and desorption/ionization on silicon mass spectrometry" *J Mass Spectrom.* 40, 1000-1004 (2005)

○ Daimon E, Wada Y. "Role of neutrophils in matrix metalloproteinase activity in the preimplantation mouse uterus" *Biol Reprod* 73, 163–171 (2005)

○ Nishiuchi R, Sanzen N, Nada S, Sumida Y, Wada Y, Okada M, Takagi J, Hasegawa H, Sekiguchi K. "Potentiation of the ligand-binding activity of integrin alpha3beta1 via association with tetraspanin CD151." *Proc Natl Acad Sci U S A.* 102, 1939-1944 (2005)

（2） 特許出願

H17 年度出願件数：7 件（CREST 研究期間累積件数：9 件）