

糖鎖を用いた生体機能材料の開発

Glyco-Biomaterials

北陸先端科学技術大学院大学 マテリアルサイエンス研究科 准教授 三浦 佳子

YOSHIKO MIURA (Associate Professor)

School of Materials Science, Japan Advanced Institute of Science and Technology

1. はじめに

糖といったら、何を思い浮かべるだろう? 普通は甘い砂糖のことを思うだろう。甘い砂糖は生物の、特に我々のエネルギー源として重要な役割を担っている。砂糖はスクロース{ α -D-グルコピラノシル(1-2)- β -フルクトフラノシド}という物質である。スクロースを構成するそれぞれのグルクトース、フルクトースといった、単位が糖(sugar、saccharide)、炭水化物(carbohydrate)として分類される。

糖類は砂糖だけでなく、紙や木材を構成するセルロース、こんにゃく芋を構成するグルコマンナンなども糖類として分類されている。古く糖類は $C_mH_{2n}O_n$ のような元素の構成になると考えられてきたが、分子の化学構造が広く知られるようになるにつれ、キチンキトサンなどについても、炭化水素骨格を持つポリオールでグルコシド結合を持つことから、糖類であると考えられるようになった。窒素を含む糖類だけでなく、リン酸や硫酸を含む糖類など多様な化合物が糖類である。それゆえ、糖類に含まれる化合物は非常に幅広くなっている(図1)。

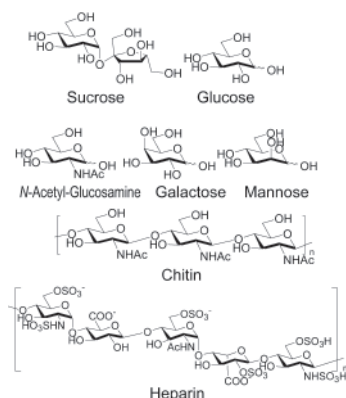


図1 様々な糖類の化学構造

糖類には、生物において、スクロース、グルコースのように生命のエネルギー源として用いられている化合物類から、キチンキトサンなどのように甲殻類の骨格として働いているもの、本稿で扱うような生命シグナルとして働くものなどがある。糖類の働きは、生命の機械として働くタンパク質や遺伝暗号を司る核酸(DNA、RNAなど)に比べると、地味であるものの、その役割は多様でかつベーシックであるが、とても奥深い。

糖類が結合した糖鎖の役割が大きな注目を集めるようになったのは、糖鎖が生命現象の認識シグナルとして働いていることが明らかになってきたからである¹⁾。例えば、糖鎖は細胞の接着や分化、癌細胞の転移、感染症の感染などに細胞表層の糖鎖とタンパク質の相互作用が関係していることが分かってきたのである。例えば、癌が体の遠い部位まで転移していく理由、ウイルスが種を超えて感染しない理由など、生命現象の不思議さの多くに糖鎖の相互作用が関係している。生命現象は巧みな分子認識現象の集積から成り立っていて、糖鎖-タンパク質の相互作用は、生命現象の重要なカギを握っている。

糖鎖にかかわる分子認識の例について表1に示した²⁾。糖鎖と細胞、病原体の相互作用は、その多くについて未だ明らかにされていない。しかしながら、細胞の表面は必ずと言っていいほど大量の糖鎖に覆われていて、細胞の接着や病原体の感染など、細胞膜を介する現象については何らかの形で糖鎖が関係していると考えられている。そのため、未知のタンパク質や細胞がどのように糖鎖を認識しているかを解析することが、生命の仕組みを明らかにする上で重要視されている。

糖鎖を認識するタンパク質(表1)については、糖鎖を認

表1 毒性タンパク質、病原体などが認識する糖鎖の例

種類	名前	由来	認識する糖鎖
レクチン	リシン	<i>Ricinus communis</i>	Gal β 1-4Glc Gal β 1-4GlcNAc
細菌毒素	コレラ毒素、コレラ菌	コレラ菌 (<i>Vibrio cholera</i>)	GM1:Gal β 1-3(NeuAc α 2-3)GalNAc β 1-4Gal β 1-4GlcCer
細菌毒素	大腸菌易熱性毒素	大腸菌 (<i>E. coli</i>)	GM1:Gal β 1-3(NeuAc α 2-3)GalNAc β 1-4Gal β 1-4GlcCer
細菌毒素	志賀毒素 (Shiga toxin)	病原性大腸菌 (<i>E. coli</i> 157, H7)	Gb3:Gal β 1-4Gal β 1-4GlcCer
細菌毒素	大腸菌 1 型アドヘシン	大腸菌 (<i>E. coli</i>)	Man α -
ウイルス	ヒトインフルエンザ A 型ヘマグルチニン	ヒトインフルエンザ A 型	Neu5Ac α 2-6Gal β 1-4(3)GlcNAc β 1-, Neu5Ac α 2-6Gal β 1-3GalNAc β 1,
ウイルス	トリインフルエンザ A 型ヘマグルチニン	トリインフルエンザ A 型	Neu5Ac α 2-3Gal β 1-4(3)GlcNAc β 1, Neu5Ac α 2-3Gal β 1-3GalNAc β 1,
その他	アミロイド β		GM1:Gal β 1-3(NeuAc α 2-3)GalNAc β 1-4Gal β 1-4GlcCer

識するが抗体ではないものを総称して、レクチンという。植物に含まれるいくつかのレクチンが試薬として販売され、糖鎖認識のモデルとして深く研究されている。一つの毒素ユニットと5つの糖鎖認識ユニットのAB5構造を持つ毒素タンパク質もレクチンであり、糖鎖を強く認識することが知られている。AB5構造を持つ毒素タンパク質については、コレラ菌の産生するコレラ毒素、病原性大腸菌O157などが産生する志賀毒素(ペロ毒素)、百日咳毒素などがある。また、インフルエンザウイルスをはじめとする各種ウイルスの感染についても、糖鎖とタンパク質の相互作用が大きく関与している。細胞については、肝実質細胞と糖タンパク質糖鎖の相互作用が有名である。

2. 糖鎖を用いた材料設計と多価効果

糖鎖の生命現象における働きは見事であり、これを利用することが望まれている。しかしながら、糖鎖とタンパク質の相互作用は一般にはそれほど大きなものではない。

糖鎖とタンパク質の相互作用は通常では弱く、むしろ、タンパク質との非特異的な相互作用を防ぐ傾向が強い。自然界では、これをどのようにして利用しているのであろうか。一つの糖から発生する相互作用は弱い、これが2個、3個…10個、20個と積み重なると次第に強くなっていく。このように糖鎖が集積されることで、強い相互作用を発揮することを多価効果、糖鎖クラスター効果などと呼ぶ³⁾(図2)。実際に、細胞表面の糖脂質では、“ラフト”や“カベオラ”と呼ばれるような集合構造が存在することが知られてい

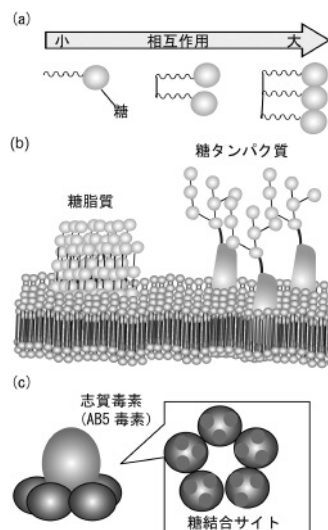


図2 多価効果の発現機構。(a)糖鎖の多価化合物によるタンパク質との相互作用の増強、(b)天然の糖鎖多価化合物:ラフト様糖脂質集合体と糖タンパク質糖鎖の模式図、(c)糖認識タンパク質の持つ多価レセプターの構造例:志賀毒素

る。また、糖タンパク質糖鎖は樹状構造の糖鎖を持つことがしばしばで、糖鎖の多価効果が発生しやすい。更にはプロテオグリカン、グリコサミノグリカンなどの生理活性多糖は、多くの糖鎖から構成されている。一方で、糖鎖が集合構造を持っているだけでなく、同時にタンパク質の側も糖鎖と結合する糖鎖結合サイトが、一つのタンパク質中に幾つか存在することが多く、多価結合による糖鎖-タンパク質の相互作用の増強を助けている。例えば、レクチンであるコンカナバリンA(Man認識タンパク質)では4個の糖鎖結合サイトが、志賀毒素では15個の糖鎖結合サイトが、一つのタンパク質に存在している。

天然に見られる糖鎖の多価構造を考えるならば、これらを模倣した分子や材料は利用可能と考えられる。例えば、糖鎖の多価化合物としては、糖鎖をペプチドや dendrimer、ポルフィリン、カリックスアレーンなどを土台として複数の糖鎖が密集した分子が報告されている。一方で、我々は、糖鎖の多価化合物を設計する上で、高分子の側鎖に糖鎖を結合させた糖鎖高分子や、薄膜上に自己組織化単分子膜などとして糖鎖を並べた糖鎖薄膜の設計と材料化の実験を行っている⁴⁾(図3)。糖鎖高分子や糖鎖薄膜は、糖鎖の価数が非常に大きく、天然物に遜色ない、またはそれよりも強い相互作用を起こすことができる。更には、高分子や薄膜といった材料特性が付与されることが特徴である。高分子化合物では、高分子として材料を構成する力があるだけでなく、プラスチック、繊維、金属などにグラフト(化学結合によって高分子を結合させること)する

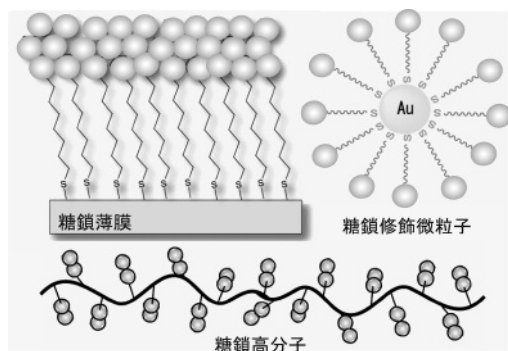


図3 糖鎖材料の例。糖鎖薄膜、糖鎖修飾金微粒子、糖鎖高分子。

ことで、新しい機能を付与した材料とすることができる。また、我々の研究では、糖鎖が結合したビニル化合物(糖鎖高分子モノマー)を調製した上で、ラジカル重合によって高分子を得ている。モノマーを合成した後は、ラジカル開始剤を用いた簡単な反応を利用することで、高分子化合物にしたり、共重合化合物にしたり、表面に高分子を結合させたりと、多様な材料への展開が可能になる。最新のラジカル重合手法である、リビングラジカル重合を利用した精密な高分子の合成も可能である。

また、糖鎖の薄膜の場合には薄膜の支持基板に工夫を施すことによって、糖鎖の生体認識性だけでなく、基板の性質を付与することができる。金属や半導体、微粒子などを支持基板として用いれば、生体認識性を持つ複合材料になる。金属基板上の糖鎖の超薄膜では、金属の導電性を生かすことで、電気化学反応を行うことのできる糖鎖材料を開発することができる。また、金属基板として、金基板を用いれば、電気化学反応、水晶共振子(QCM)、表面プラズモン共鳴(SPR)を利用することができる複合材料となる。微粒子では、微粒子の光特製、蛍光特性を利用した材料になり、微粒子ゆえの分散性を考えると *in situ* での生体観察やセンシングを可能にする材料になる。

3. 病原体と結合する糖鎖高分子

前述のように、糖鎖は様々な生命現象に関与している。我々の生命を脅かすような感染症に焦点を絞るならば、糖鎖を用いた材料ではどういったことが可能になるだろうか。

糖鎖を側鎖に持つ糖鎖高分子では、多価効果に基づいて、糖鎖を認識するタンパク質と効果的に作用する(図4)。例えば、毒素タンパク質の一つ志賀毒素(病原性大腸菌O157産生毒素)は、 α -ガラクトースを末端に持つ糖脂質(Gb3)を

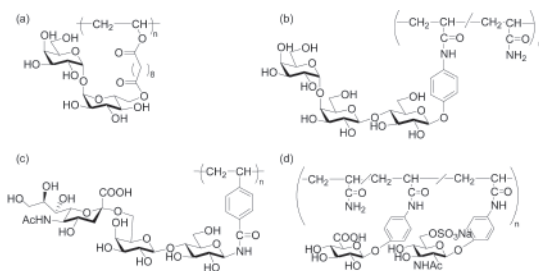


図4 糖鎖高分子の構造式(a)トレハロース構造を利用した志賀毒素を中和する糖鎖高分子、(b)グロボトリオース型の志賀毒素を中和する糖鎖高分子、(c)インフルエンザウイルスを中和するシアリルラクトース結合型の糖鎖高分子、(d)アルツハイマーアミロイド β タンパク質に結合するグリコサミノグリカンモデル型の糖鎖高分子。

認識して作用する。我々は、 α -ガラクトースを有する、ガラクトース型トレハロース(グロボジオースミミック体)を側鎖に持つ糖鎖高分子を合成した⁵⁾。この糖鎖高分子と志賀毒素との相互作用を測定したところ、単体の糖鎖では殆ど毒素に対する結合性が見られないものの、高分子体では強く結合することが明らかになった。また、Gb3糖鎖を持つ高分子やデンドリマーでも、志賀毒素と強く結合して、細胞毒性を中和することが分かっている⁶⁾。志賀毒素を無毒化する薬剤は知られていないことから、糖鎖多価体を利用したアプローチは貴重である。更には、糖鎖高分子の材料形成能を利用して、志賀毒素を除去する透析材料の開発が検討されている。糖鎖高分子を固定化させた透析材料は志賀毒素を毒素型の差異によらず除去することが可能である⁷⁾。高分子を利用して病原体毒素を血中から取り除くことが可能になれば、新しい治療手法として、実現可能かもしれない。

同様に高分子の側鎖にインフルエンザウイルスと結合するシアリルラクトースを結合させた材料では、インフルエンザウイルスと結合性を持つようになった⁸⁾。インフルエンザウイルスはNeu5Ac α 2-6Gal(ヒト、ブタ)やNeu5Ac α 2-3Gal(トリ、ブタ)と結合するが、単独では結合が弱いため、糖鎖高分子を用いた手法は有用である。糖鎖結合性が明らかにされている各種の病原体(ウイルス、毒素タンパク質、細菌類)については、糖鎖高分子と結合するものと考えられる。

インフルエンザウイルスに限らないが、ウイルスは細菌類よりもずっと小さく、毒素タンパク質と違って感染によって増殖する危険な性質がある(毒素タンパク質は菌体がなければ増えない)。実際、ウイルスの大きさは我々の部屋を一つの細胞に例えるならば、小さな黒い点のようなものであり、とても小さい。人間の感覚で、目の細かく見える繊維を使っても、ウイルスの大きさから考えると障害にはならない。昨今

世間をにぎわしている、新型インフルエンザについても、通常のマスクをかけていても、完全に感染を防ぐことはできない。特定のウイルスと強く結合する糖鎖高分子の基材を利用して繊維や除去カラムを作れば、こうしたウイルスの除去も可能になると考えられる。

また、我々は、現在グリコサミノグリカンという生理活性多糖のモデル高分子の開発やこれを用いた材料、デバイスの開発を進めている⁹⁾。グリコサミノグリカン類は硫酸化糖鎖とウロン酸を含む生理活性多糖であり、殆どすべての細胞表面に存在して、細胞間のコミュニケーションや活動に関係している。グリコサミノグリカンの構造自体は複雑であり、これらを全合成しようとするチャレンジは現在も多くの研究者によって続けられているが、簡単ではない。我々は、グリコサミノグリカンが多糖という天然高分子であることから、高分子体として再構築する手法を考えた。グリコサミノグリカンに含まれる糖鎖の一つである、6位硫酸化グルコサミンやグルクロン酸をアクリルアミド誘導体として、これを重合し、グリコサミノグリカンのモデル高分子を得た。グリコサミノグリカンが関わる生体反応の一つとして、アルツハイマー病への関与が指摘されており、タンパク質の線維化や抑制に関わると考えられている。種々のグリコサミノグリカンモデル高分子を合成して、アミロイド β タンパク質の凝集を調べた。硫酸化糖を持つ糖鎖高分子については、アルツハイマーアミロイド β (1-40,1-42,25-35)と結合して凝集を抑制する働きがあることがわかった。そして、これらの細胞毒性を減らす働きがあった。グリコサミノグリカンモデル高分子については、硫酸化糖の含有率や糖鎖高分子の分子量によってアミロイド β タンパク質との結合活性が変化した。多様な働きを持つグリコサミノグリカンの生理活性機能について、硫酸化糖鎖の高分子を利用してライブラリーを作成して、再現することができると思われる。グリコサミノグリカンの働きに応じて、その他のウイルスや細菌類の感染を防ぐこともできるかもしれない。

4. 病原体を検出する糖鎖材料

糖鎖と病原体の結合性を利用することでバイオセンサーとして用いることもできる。金や金微粒子と糖鎖を結合させた人工材料によるアプローチを紹介したい。

我々は、志賀毒素に対して結合する糖鎖の材料を作成してきた¹⁰⁾。Gb3糖脂質の糖鎖部分(グロボトリ

オース)を合成して、アルキルジスルフィドと結合させた人工糖脂質を合成し、これを金基板とともにインキュベートして、自己組織化単分子膜を調製した。自己組織化単分子膜を利用すると、密にパッキングした薄膜を得ることができ、細胞表面の糖脂質集合体(ラフト領域など)と似た構造を取ることから、良好なタンパク質認識場となる。糖脂質薄膜を結合させた自己組織化膜を水晶発振子に結合させたバイオセンサーを作成し、この薄膜に、志賀毒素をインジェクトした。すると、毒素の添加とともに、水晶発振子の振動数が素早く変化して、1nM程度の毒素溶液で30分以内に振動数の変化が終了し、毒素を検出できることがわかった。更には毒素の検出については特異性が高く、志賀毒素以外の牛血清アルブミンなどのタンパク質や、培養混合液などを加えた時には、検出されないことがわかった。同様にGb3糖鎖と糖構造が異なるラクトースを結合させた基板では、志賀毒素の結合は殆ど見られなかった¹¹⁾。このように、Gb3糖鎖を結合させた薄膜上では、細胞表面上さながらの厳密な生体分子認識が行われており、金基板を利用して信号としてとらえることができれば優れたバイオセンサーになる(図5)。

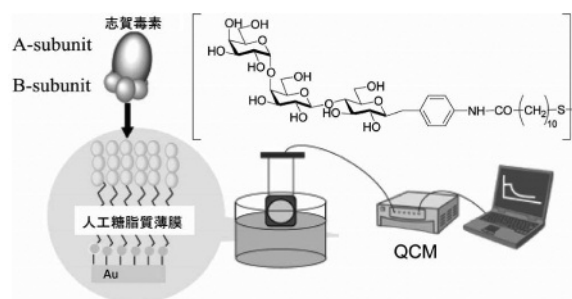


図5 人工糖脂質薄膜を利用した志賀毒素のバイオセンサー。人工糖脂質の構造とバイオセンサーデバイスの仕組み。

糖鎖を用いたバイオセンサーで呈される疑問は、抗体との違いを明確にして、糖鎖薄膜の結合特性を明らかにできるかということである。志賀毒素は糖鎖結合サイトが一つのタンパク質に15個と密集していることから、糖鎖認識性が強い。実際に結合定数は 10^7 - 10^8 (M^{-1})程度であり、通常のレクチンの結合定数 10^3 - 10^4 (M^{-1})などに比べると1000倍程度も強い。抗体を用いた分子認識では、同一の手法で沢山の種類の検体のバイオセンシングが可能になるかもしれないが、AB5構造を持つような特定の毒素タンパク質については、我々の例にもあるような糖鎖のセンシングに利があるかもしれない。AB5毒素については、病原性大腸

菌O157の産生する志賀毒素だけでなく、コレラ毒素や百日咳毒素などの毒素タンパク質も同様の構造を持っており、糖鎖結合サイトを多くもっている。それゆえ、このような毒素タンパク質も糖鎖をプローブとした手法によって検出できるものと考えられる。コレラ毒素についてはBサブユニットのリガンドがGM1糖脂質であることが知られており、多くの研究事例がある。GM1をリガンドとして、リポソームやLB膜として固定化することによって、コレラ毒素を捕らえる基板の調整を行い、QCMやSPRと結合させることによって毒素を鋭敏にセンシングすることができ、検出は数分から1時間程度で行うことができると報告されている¹²⁾。

また、アルツハイマー病についても糖鎖を用いた検出法の構築を行っている¹³⁾。我々はシアル酸を固定化した電極を作成し、電気化学に基づく検出を試みた。シアル酸は、ガングリオシドなどに含まれる機能性糖鎖であり、コレラ毒素やアルツハイマーアミロイド β など多くのタンパク質と結合し、細胞の分化を促す働きなどもあることが知られている。シアル酸を結合させた金基板では、シアル酸を認識するタンパク質と特異的な相互作用を示す。シアル酸を認識するタンパク質として、アルツハイマーアミロイド β を加えたところ、基板上的シアル酸と結合した。このとき我々は、アミロイド β タンパク質に含まれるチロシン残基の酸化還元シグナルを検出することとした。チロシンはフェノール性水酸基を持つアミノ酸であり、酸化還元反応によって、キノン型になることから、これを検出することができる。シアル酸を結合した基板にアミロイド β を付加していくと、チロシンに基づくピークが検出できる。アミロイド β の $1\mu\text{M}$ の付加でも、チロシンに基づくピークが見られる。 $10\mu\text{M}$ 程度の付加によって、このチロシンの酸化還元ピークは飽和する。一方で、インスリンについてはチロシンをタンパク質中に4つ含むが、糖鎖認識性がないために全く検出されない。

ここまで示した事例の通り、糖鎖を固定化した基板では、糖鎖を認識するタンパク質が結合する一方で、糖鎖認識タンパク質以外については殆ど結合性を示さない¹⁴⁾。タンパク質の非特異的な結合は、疎水性相互作用に大きく左右され、界面周りの水の構造などによって大きく変わる。糖鎖を固定化した基板では、疎水性相互作用が大きく抑えられるため、糖鎖以外のタンパク質については殆ど結合がみられない。オリゴ糖やデキストラン(グルコースポリマー)、糖アルコールを固定化した基板はタンパク質や細胞が結合しない材料として研究が進められていることの

方がむしろ多い。

バイオセンシングに使用するような新規の糖鎖修飾ナノ材料の開発についても少々述べよう(図6)。我々は現在、糖鎖薄膜と糖鎖高分子の双方の性質を兼ね合わせた基材として、糖鎖高分子修飾金微粒子の合成と生理活性を検討している¹⁵⁾。糖鎖高分子を合成する際に、ジチオエテルなどの可逆的付加開裂連鎖移動剤を加えて、リビングラジカル重合を行うと、容易に分子末端にチオール基(SH基)を有する高分子を得ることができる。SH基を持つ糖鎖高分子は、金基板や金微粒子と結合し、これを修飾することができる。糖鎖高分子で修飾した金微粒子は、水溶性高分子が結合したことによって、安定的に分散するようになる。そして、糖鎖高分子のタンパク質の強い認識性を併せ持つ。糖鎖認識タンパク質として、各種レクチン(コンカナバリンA、WGA)や志賀毒素を加えると、タンパク質に特異的な色調変化が観測されることがわかった。また、糖鎖を認識する大腸菌や細胞などでも、その相互作用を検出できる。こうした糖鎖修飾金微粒子を用いることで、免疫クロマトグラフィーやSPRを用いた鋭敏な検出デバイスの開発が可能と考えられる。

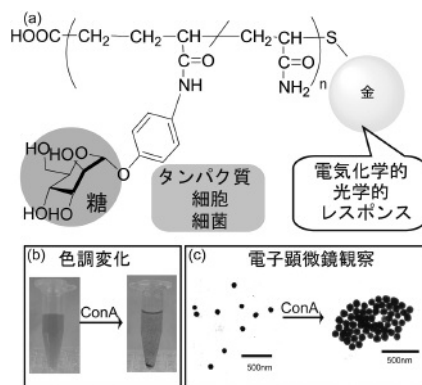


図6 糖鎖高分子を利用した金微粒子の調製。(a)糖鎖高分子修飾金微粒子の例、(b)比色測定の様子、(c)微粒子のタンパク質による凝集の電子顕微鏡観察の様子。

5. 精密な形を有する糖鎖材料

糖鎖高分子や糖鎖薄膜のような糖鎖の多価構造を持つ材料は、タンパク質、病原体と強く結合して、すぐれた生体機能を持つ。我々はこうした研究事例から、精密な糖鎖の多価構造を持つ材料を利用することによって、もっと詳細な生体機能を解析できるものと考えている。糖鎖を結合させるプラットフォームとして、デンドリマーを利用した上で、これを金基板上に自己組織化単分子膜と

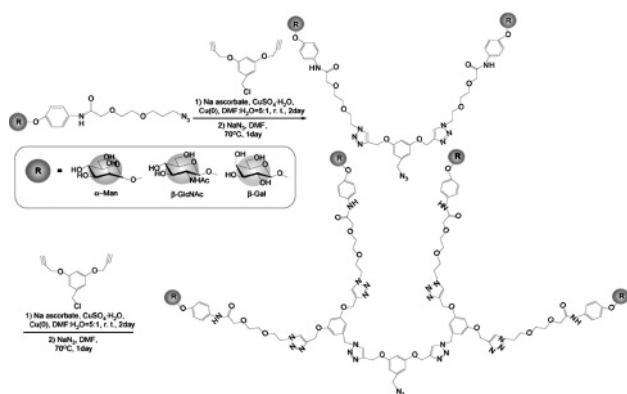


図7 糖鎖結合デンドリマーの合成と多価化合物の構造

して精密に固定化させて、QCM,SPRを用いたタンパク質の認識について検討を行っている¹⁶⁾(図7)。

各種の糖鎖デンドリマー (Gal,Man,GlcNAc結合デンドリマー)を金基板に結合させた上で、レクチンとの相互作用やタンパク質の変性などを調べている。レクチンとの相互作用では、レクチンによって糖鎖の認識最適密度が厳然と存在していることがわかった。例えば、コンカナバリンA (Man認識タンパク質)では、デンドリマーの世代の上昇によって糖鎖との相互作用が強くなるが、RCA₁₂₀ (Gal認識タンパク質)では、第二世代のデンドリマー固定化界面で最も強い相互作用を示す。こうした厳密な糖鎖構造を固定化した薄膜では、病原体の検出には必ずしも適していないが、機能がまだ分からないようなタンパク質の機能を明らかにするのに適している。

生体中で糖鎖認識性がわかったタンパク質やレクチンはまだ多くないことから、こうした糖鎖認識性について解析するツールが有用な働きを果たすと期待される。

6. おわりに

本稿では、糖鎖材料を用いた生体機能性材料への展開について示した。糖鎖は、厳密で重要な生理活性を担う分子群であり、タンパク質と結合することを追及するだけでなく、多くの応用や実用化が考えられる。ここに我々が研究を展開している糖鎖材料については多種多様な可能性が考えられるものの、実用化されているものは少ない。糖鎖材料の機能を、世の中で役立てられるように一層研究に励んでいきたい。

引用文献

- 1) M. E. Taylor, K. Drickamer, Introduction to glycobiology, Oxford University Press (2003)
- 2) 畑中研一、西村紳一郎、大内辰郎、小林一清、糖質の科学と工業、講談社 (1997)
- 3) (a) M.Mammen, S.-K. Choi, G. M. Whitesides, *Angew. Chem. Int. Ed.* **37**, 2754 (1998) (b) Y. C. Lee, R. T. Lee, *Acc. Chem. Res.* **28**, 321 (1995)
- 4) Y. Miura, *J. Polym. Sci. Part A: Polym. Chem.* **45**, 5031 (2007)
- 5) Y. Miura, N. Wada, Y. Nishida, H. Mori, K. Kobayashi, *J. Polym. Sci. Part A: Polym. Chem.* **42**, 4598 (2004)
- 6) H.Dohi, Y. Nishida, M. Mizuno, M. Shinkai, T. Koabayashi, T. Takeda, H. Uzawa, K. Kobayashi, *Bioorg. Med. Chem.* **7**, 2053 (1999)
- 7) A. Miyagawa, M. Watanabe, K. Igai, M. C. Kasuya, Y. Natori, K. Nishikawa, K. Hatanaka, *Biomaterials*, **27**, 3304 (2006)
- 8) A. Tsuchida, K. Kobayashi, N. Matsubara, T. Marumatsu, T. Suzuki, Y. Suzuki, *Glycoconjugate J.* **15**, 1047 (1998)
- 9) Y. Miura, K. Yasuda, K. Yamamoto, M. Koike, Y. Nishida, K. Kobayashi, *Biomacromolecules*, **8**, 2129 (2007)
- 10) Y. Miura, Y. Sasao, H. Dohi, Y. Nishida, K. Kobayashi, *Anal. Biochem.* **310**, 27(2002)
- 11) H. Uzawa, S. Kamiya, N. Minoura, H. Dohi, Y. Nishida, K. Taguchi, S.-I. Yokoyama, H. Mori, T. Shimizu, K. Kobayashi, *Biomacromolecules*, **3**, 411(2002)
- 12) (a) K. S. Phillips, T. Wilkop, J. J. Wu, R. O. Al-Kayasi, Q. Cheng, *J. Am. Chem. Soc.* **128**, 9590 (2006) .(b) P. Vermette, H. J. Griesser, P. Kambouris, L. Meagher, *Biomacromolecules*, **5**, 1496(2004)
- 13) M. Chikae, T. Fukuda, K. Kerman, K. Idegami, Y. Miura, E. Tamiya, *Bioelectrochemistry*, **74**, 118(2008)
- 14) R. Sighavi, Kumar, G. P. Lopez, G. N. Stephanopoulos, D. I. Wang, G. M. Whitesides, *Science*, **264**, 696(1994)
- 15) M. Toyoshima, Y. Miura, *Journal of Polymer Science Part A: Polymer Chemistry*, **47**, 1412(2009)
- 16) T. Fukuda, S. Onogi, Y. Miura, "Dendritic Sugar-Microarrays by Click Chemistry", *Thin Solid Films*, in press