

シアリダーゼの皮膚における機能解明と経皮送達技術の開発

静岡県立大学大学院薬学研究院生化学講座

南 彰

Sialidase is a hydrolase that cleaves a sialic acid residue from sialoglycoconjugate. We have previously developed a fluorescent probe (BTP-Neu5Ac) that allows highly sensitive visualization of the enzymatic activity of sialidase on tissue. Staining of the rat skin using BTP-Neu5Ac revealed intense sialidase activity in the lower layers of the dermis. However, the role of sialidase in the skin is not well understood. In the present study, we investigated the role of sialidase in the skin and developed the transdermal delivery technology of sialidase. We first examined changes in sialidase activity with aging and found that sialidase activity increased with growth and decreased with aging. Next, to investigate the role of sialidase, we delivered the sialidase to the dermis and studied its effect on elastin which gives skin elasticity. The barrier function of the skin is high and cannot allow substances with a molecular weight of 500 or more to pass through. Therefore, we used choline and geranate (CAGE), one of the ionic liquids, to deliver sialidase transdermally. CAGE can provide the sialidase subcutaneously while maintaining the enzymatic activity. The elastin level in the dermis was increased by applying sialidase from *Arthrobacter ureafaciens* with CAGE on the skin for five days in rats and senescence-accelerated mice prone 1 and 8. Sialidase activity in the dermis was considered to be mainly due to Neu2 based on the expression level of sialidase isozyme mRNA. Transdermal administration of Neu2 with CAGE also increased the level of elastin in the dermis. Therefore, Neu2 would be involved in elastic fiber assembly. The reduction of elastin in the skin causes various skin diseases as well as wrinkles and sagging with aging. Thus, transdermal administration of sialidase is expected to be helpful for the improvement of wrinkles and skin disorders due to the loss of elastic fibers.

1. 緒 言

シアリダーゼは、糖タンパク質や糖脂質などの糖鎖構造からシアル酸を脱離する加水分解酵素である。研究代表らはこれまでに、組織においてシアリダーゼの酵素活性をイメージングすることができる蛍光プローブ Benzothiazolylphenol-based sialic acid derivative type 3 (BTP3-Neu5Ac) を開発した(図1)¹⁻³⁾。BTP3-Neu5Ac は抗体を利用してタンパク質を検出する免疫組織染色とは異なり、酵素活性を検出できる利点がある。BTP3-Neu5Ac は無蛍光で水に可溶性であるが、シアリダーゼによる加水分解を受けるとBTP3を遊離する。BTP3は150nm程度の大きなストークスシフトをもつ強い緑色蛍光物質であり、水に不溶であるため組織に沈着することで染色される。染色方法は比較的簡便であり、BTP3-Neu5Ac (10-1,000 μ M) を含む緩衝液中で30分程度インキュベートした後、組織や切片を緩衝液で洗浄することで完了する。

BTP3-Neu5Acでラット脳を染色すると、脳梁や内包といった白質領域が強く染色される。また、記憶領域であ

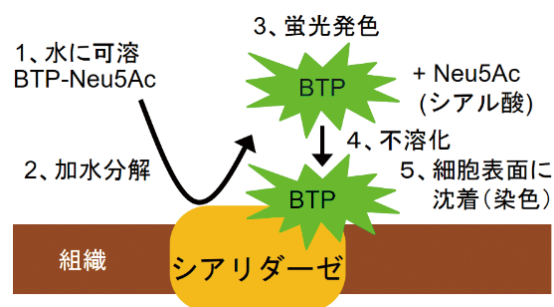


図1 BTP3-Neu5Acの染色原理

る海馬においては、主要な興奮性神経線維である苔状線維の神経終末が強く染色される。このような脳におけるシアリダーゼ活性の分布情報を利用して、シアリダーゼが認知機能に不可欠であることが見いだされている⁴⁻⁶⁾。また、BTP3-Neu5Acでマウス膵臓を染色したところ、インスリンを分泌する膵臓のランゲルハンス島に比較的強いシアリダーゼ活性があることが分かった。このイメージング情報を利用して、シアリダーゼがインスリンの分泌に関与することや、シアリダーゼ阻害剤2,3-dehydro-2-deoxy-N-acetylneuraminic acid (DANA) がインスリン分泌を促進することが見出された⁷⁾。DANAは低血糖時にはインスリン分泌に影響しないことから、低血糖の副作用を回避することができる糖尿病の治療薬として実用化できると期待されている。これまでに大腸癌は強いシアリダーゼ活性を持つことが報告されている。そこでBTP3-Neu5Acでヒトの大腸癌を染色したところ、大腸癌を高感度で検出され



Role of sialidase in the skin and transdermal delivery technology of sialidase

Akira Minami

Department of Biochemistry, School of Pharmaceutical Sciences, University of Shizuoka

た²⁾。現在、内視鏡で腸癌と思われる部位に吹きかけることによって、癌細胞を取り残すことなく除くことができる技術の開発を目指している。最近では、BTP3-Neu5Acがインフルエンザウイルスに感染した細胞の検出や薬剤耐性株の検出に活用することができることが分かった⁸⁾。

様々な組織をBTP3-Neu5Acで染色する過程で、皮膚の真皮に強いシアリダーゼ活性があることを見出した。皮膚は、コラーゲンやヒアルロン酸、エラスチンなどの細胞外マトリックス成分で構成される。細胞外マトリックスの最も巨大な構造はエラスチンで、皮膚、肺、動脈などの組織に豊富に存在している。長期間の日光曝露により損傷を受けた皮膚では、エラスチン含有物質が真皮に蓄積し、最終的に弾力性の欠如に至る(光老化)。逆に、太陽光から保護された皮膚では、エラスチン線維は加齢とともに減少し、シワやたるみ、皮膚障害の原因となる(図2)。エラスチンのターンオーバーには長い時間がかかるため、失ったエラスチンを再生することは難しい。

哺乳類のシアリダーゼにはNeu1、Neu2、Neu3、Neu4の4つのアイソザイムが存在する(図3)。これらの4つのアイソザイムは、発現する組織や細胞内局在、基質特異性、至適pHが異なる。主にリソソームに局在するシアリダーゼアイソザイムNeu1は、細胞表面においてエラスチン結合タンパク質(EBP)と複合体を形成することが報告されている。Neu1によるミクロフィブリルからのシアル酸の遊離は、エラスチン集合を促進する。このことから、真皮に検出されるシアリダーゼ活性は、エラスチン産生に関与すると考えられる。真皮におけるシアリダーゼの機能を解明する過程で、皮膚におけるシアリダーゼ活性が加齢とともに著しく低下することが明らかとなった。真皮にシアリダーゼを送達することで、加齢に伴うエラスチンの減少を回復させることができると考えられる。

本研究では初めに、皮膚におけるシアリダーゼ活性の分布と加齢によるシアリダーゼ活性の変化について検討した。また、シアリダーゼの経皮送達がエラスチン産生に及ぼす影響について検討した。経皮投与では角質層が皮膚のバリアーとなり、一般的に分子量500以上の物質を透過することができない。効果的かつ非侵襲的な経皮吸収のためには、最適な経皮輸送基剤の選択が必要となる。イオン液体は、陽イオンと陰イオンからなる低融点溶解塩として知られている。イオン液体のうちCholine and geranate (CAGE)は低分子化合物からペプチドやタンパク質などの高分子化合物まで様々な種類の薬剤を効率的に経皮投与できる(図4)。ここでは、経皮送達基剤としてCAGEを利用した。

2. 方法

2.1. シアリダーゼ活性のイメージング

Wistar系雄性ラット(12週齢、日本SLC)から皮膚、筋肉、

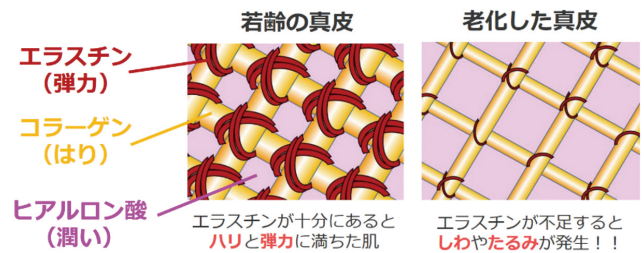


図2 皮膚の老化に伴うエラスチン量の減少

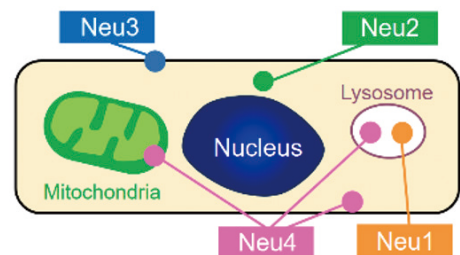
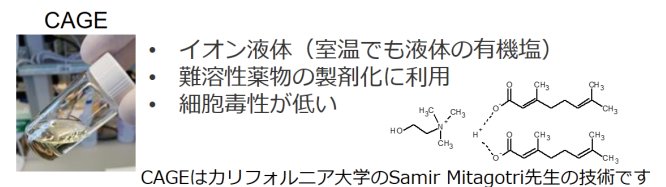


図3 哺乳動物のシアリダーゼアイソザイム



CAGEはカリフォルニア大学のSamir Mitagotri先生の技術です

図4 経皮酵素送達基剤CAGE

皮下脂肪を含む腹側部組織を採取し、Tissue-Tek OCTコンパウンド(サクラファインテックジャパン)で包埋した。凍結後、100-300μm厚の切片を作製した。1mM BTP3-Neu5Ac(27℃)で染色した後、PBSで洗浄し、蛍光顕微鏡(ex/em: BP330-385/BA510IF、またはBP340-380/BA500-550)で蛍光を観察した。カメラの検出感度は染色していない皮膚切片のバックグラウンド蛍光を検出しないレベルに設定した。写真を撮った後、スライスに4%パラホルムアルデヒドで固定し、ヘマトキシリン・エオジンで染色した。

2.2. シアリダーゼ活性の測定

ラット皮膚のホモジネートを96ウェルプレートに移し、10μM 4MU-Neu5Acを含むPBS中で27℃、60分間インキュベートした。炭酸ナトリウム緩衝液(500mM、pH10.7)を加えた後、マイクロプレートリーダー(ex/em, 355nm/460nm)を用いて遊離した4MUの蛍光強度を測定した。

2.3. CAGE中のシアリダーゼの安定性評価

Arthrobacter ureafaciens由来シアリダーゼ(AUSA)を10mU/mLでCAGEまたはPBSに溶解し、27℃で28日間静置した。その後、4MU-Neu5Acでシアリダーゼの酵素活性を測定した。

2. 4. シアリダーゼの経皮投与

ラットやSAMP1、SAMP8の腹側部の皮膚を剃毛した後、CAGEに溶解したシアリダーゼAUSA (1U/mL)を1日2回、5日間にわたって塗布した。真皮組織を採取し、ホモジナイズした。ホモジネート中のシアリダーゼ活性は、4MU-Neu5Ac (40μM)を用いて測定した。真皮から抽出したエラスチン含有量は、定量色素5, 10, 15, 20-tetraphenyl-21, 23-porphine tetra-sulfonate (Fastin Elastin Assay Kit)を利用して測定した。

2. 5. 免疫組織化学染色

真皮の伸展切片を4%パラホルムアルデヒドで固定した後、2%ヤギ血清でブロッキングした。エラスチンの染色では、切片をウサギ抗エラスチンポリクローナルIgG (Bioss Antibodies) およびFITC標識ヤギ抗ウサギIgG (Jackson ImmunoResearch Laboratories)により染色した。Neu2の染色では、切片をウサギ抗Neu2ポリクローナルIgG (Rockland, Gilbertsville, PA) およびHiLyte Fluor 555標識ヤギ抗ラビットIgG (Anaspec, Fremont, CA)で染色した。また、DAPI (1g/mL)で対比染色を行い、蛍光顕微鏡BZ-X710で観察した。蛍光のバックグラウンドレベルは、二次抗体のみで染色した切片を利用して決定した。すべてのイメージングは少なくとも2回実施し、再現性を確認した。

2. 6. エラスチンの自家蛍光の観察

真皮切片を4%パラホルムアルデヒドで固定した後、蛍光顕微鏡 (BZ-X810, ex/em: BP450-490/BA500-550)で自家蛍光を観察した。

2. 7. リアルタイムRT-PCR

TRIzol 試薬 (Life Technologies)を用いて、ラットの腹側部の皮膚や脂肪などの組織からmRNAを抽出した後、サーマルサイクラーシステム (Thermal Cycler Dice Real-Time System Lite, タカラバイオ)とOne-Step SYBR PrimeScript PLUS RT-PCR キット (Perfect Real Time, タカラバイオ)を利用してmRNAを定量した。グリセルアルデヒド-3-リン酸デヒドロゲナーゼ (GAPDH)のmRNAを内部標準として利用した。以下に使用したプライマーの配列を示す。

Neu1: 5'-CCCATCCCGAGTACCGAGT-3'と5'-CCCGGCCACAACCTGGAC-3'

Neu2: 5'-GAGCCACCAACCATGTCAAG-3'と5'-AAGGGACATGATTCATGGAG-3'

Neu3: 5'-CGGAGCTGTGAGCTGAG-3'と5'-CCTGCTGGAACAGTGCTG-3'

Neu4: 5'-TCTGGAGTGCCAACTGGC-3'と5'-AAGGAAGTGCCTTCATCAGCAC-3'

エラスチン: 5'-GCTTAGAGTCTCAACAGGTGC-3'と5'-CGGAACCTTGGCCTTGACTC-3'

GAPDH: 5'-TGAACGATTTGGCCGTATCGG-3'と5'-TCAATGAAGGTCGTTGATGG-3'

2. 8. Neu2の経皮投与

先に樹立したラットNeu2を安定に発現するC6ラットグリオーマ細胞から分泌されたNeu2を、限外ろ過フィルター (Amicon Ultra)を用いて回収した。4MU-Neu5AcでNeu2のシアリダーゼ活性を測定した。Neu2 (21.3nmol/min/mL)とCAGEを3:7の割合で混合した。剃毛後、Neu2とCAGEの混合物60μLをラット (12週齢)の側腹部皮膚に塗布した。または、Neu2を18μL塗布した後、CAGEを42μL塗布した。塗布は1日2回、5日間行った。真皮に含まれるエラスチンは、2.4.と同様の方法で定量した。

2. 9. 統計解析

統計解析は、Bonferroniの多重比較検定を伴う一元配置分散分析、およびt検定を利用した。2群間の分散が異なる場合は、Welchの補正を加えたt検定を利用した。

3. 結果

3. 1. 皮膚組織におけるシアリダーゼ活性の加齢に伴う変化

皮膚におけるシアリダーゼ活性の分布を調べるために、12週齢のラット腹側部を100μM BTP3-Neu5Acで染色した。ヘマトキシリン・エオジン染色で確認された真皮下層や筋肉に強いシアリダーゼ活性は検出された (図5A)。また、皮膚におけるシアリダーゼ活性の加齢による変化を調べたところ、胎生19日から12週齢にかけて上昇した。21ヶ月齢以上のラット皮膚におけるシアリダーゼ活性は、12週齢のラット皮膚における活性と比較して著しく減弱した (図5B)。

3. 2. シアリダーゼの経皮送達による皮膚エラスチン量の増加

次に、シアリダーゼの経皮投与がエラスチン量に及ぼす影響について検討した。初めに、経皮輸送基剤CAGEによって酵素活性が変化しないことを確認した (図6A)。次に、経皮輸送基剤CAGEを使用してシアリダーゼ (AUSA)を1日2回、5日間皮膚に塗布すると、ラット皮膚におけるシアリダーゼ活性が増加した (図6B)。また、ラット皮膚に含まれるトロポエラスチンを含むエラスチンの総量を測定したところ、エラスチン量が増加した (図6C)。

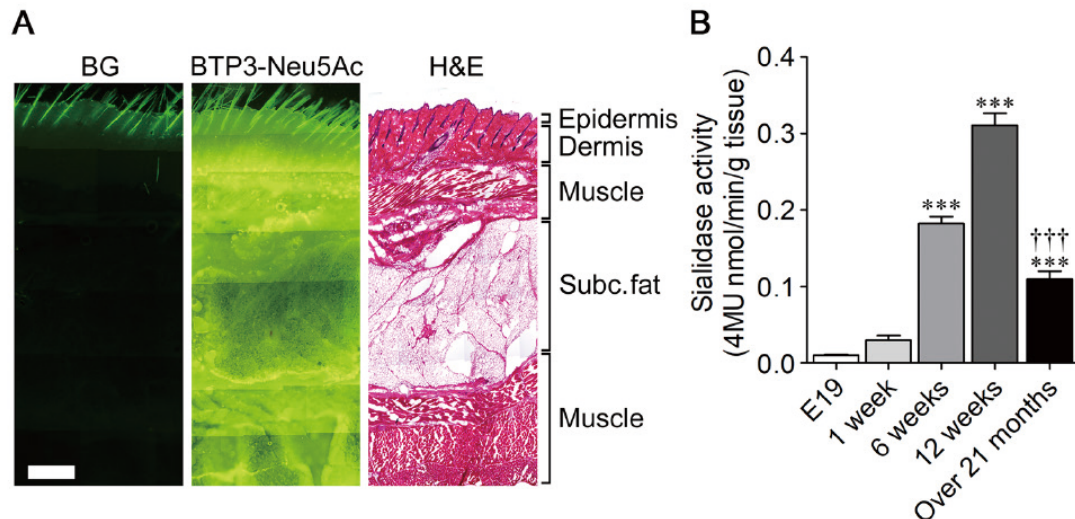


図5 ラット皮膚におけるシアリダーゼ活性の分布と加齢に伴う変化
(A) BTP3-Neu5Acによるラット皮膚のイメージング、(B) 老化に伴う皮膚シアリダーゼ活性の減弱

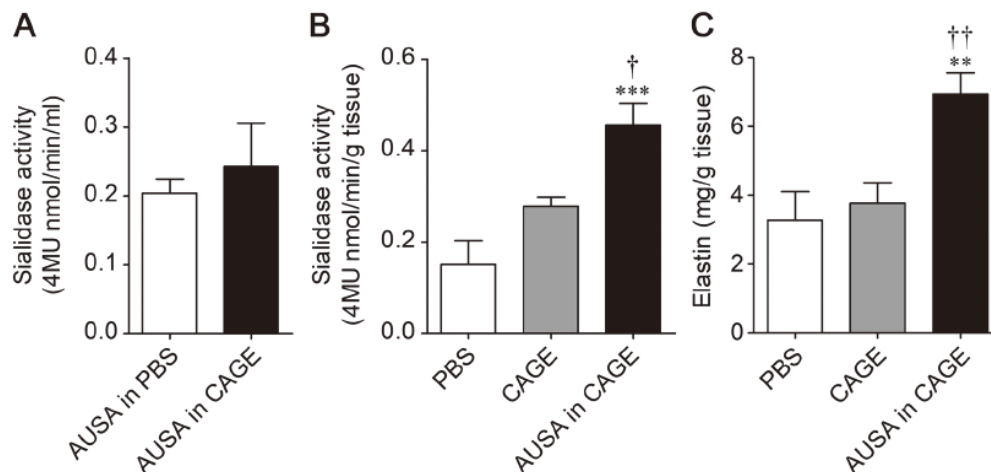


図6 シアリダーゼの経皮送達によるエラスチンの増加
(A) CAGEがシアリダーゼ活性に及ぼす影響、(B, C) シアリダーゼの経皮送達後における真皮のシアリダーゼ活性(B) およびエラスチン量(C) の増加

BTP3-Neu5Acによるシアリダーゼ活性のイメージングにおいても同様に、AUSAを経皮投与すると真皮に強いシアリダーゼ活性が観察された(図7A)。また、伸展切片の免疫組織染色およびエラスチン自家蛍光の観察において、AUSA投与後の真皮にエラスチンの高い発現が認められた(図7BおよびC)。

3. 3. シアリダーゼの経皮送達による老化促進マウスの皮膚エラスチン量の増加

老化促進モデルマウス(SAM)は、寿命が短く、老化症状の早期出現と急速な進行を特徴とするマウスであり、AKR/J系統の近親交配により、これまでに9系統の老化促進マウス(SAMP)と3系統の老化抵抗性マウス(SAMR)が確立されている。SAMP1系統は、老化アミロイドシ

スと免疫不全が特徴である。SAMP1系統は、12-18ヶ月齢でエラスチンと表皮の厚みが増加し、明らかなエラストーシスに発展し、その特徴はヒトの光老化と類似している。SAMP8系統は、アルツハイマー病様の神経変性と認知障害および概日リズム障害を特徴とする。SAMP8マウスは野生型マウスの老化と比較的類似した老化症状を示す。

本研究では、SAMP1およびSAMP8を用いて、エラスチン量に及ぼすAUSAの影響を検討した。AUSAを含むCAGEを1日2回、5日間経皮投与したところ、SAMP1およびSAMP8でエラスチン量が有意に増加した(図8AおよびB)。

3. 4. 皮膚におけるシアリダーゼアイソザイムの発現

真皮における強いシアリダーゼ活性が哺乳動物シアリダ

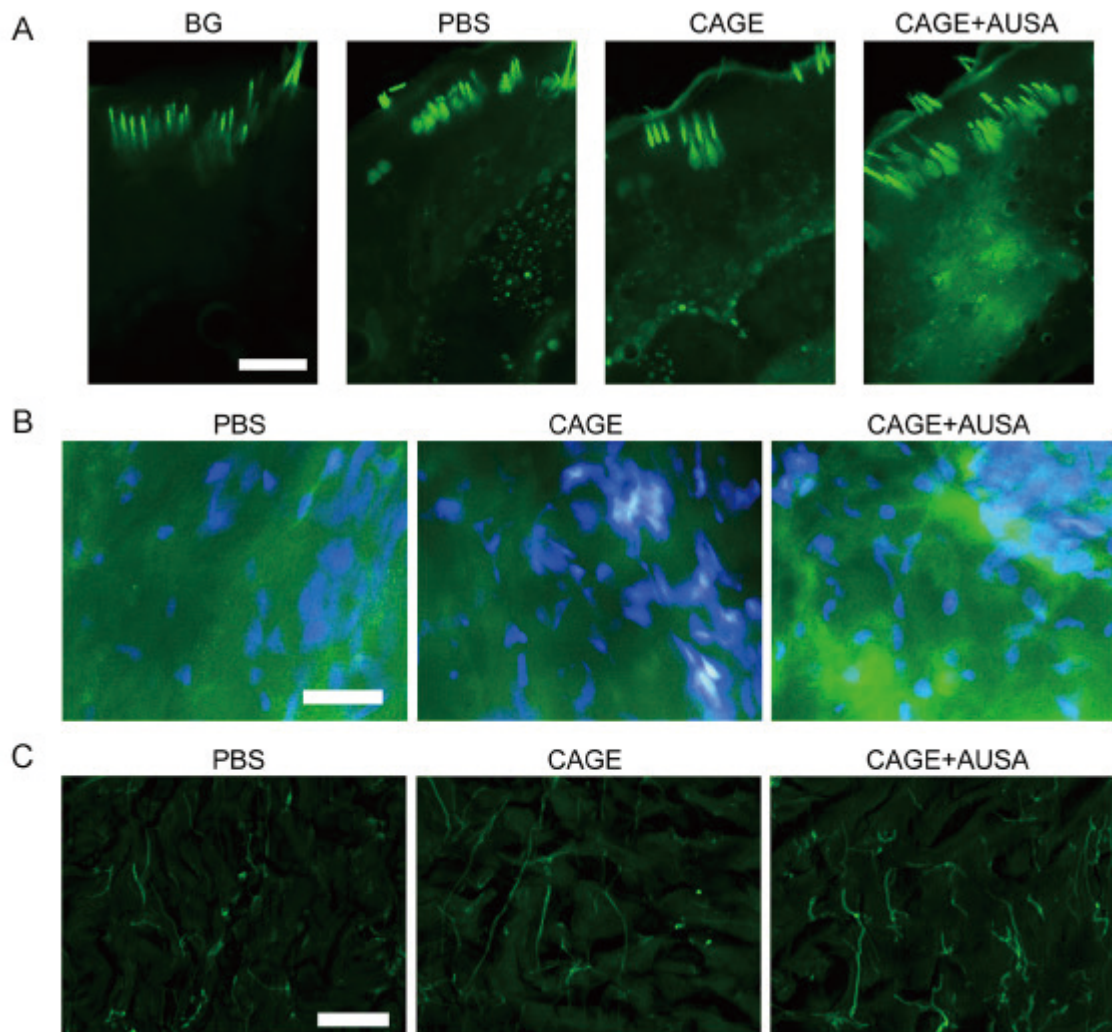


図7 シアリダーゼの経皮送達によるエラスチンの増加
(A-C) シアリダーゼの経皮送達後における真皮のシアリダーゼ活性(A)、およびエラスチン量(B: 免疫組織染色; C: 自家蛍光観察)の増加

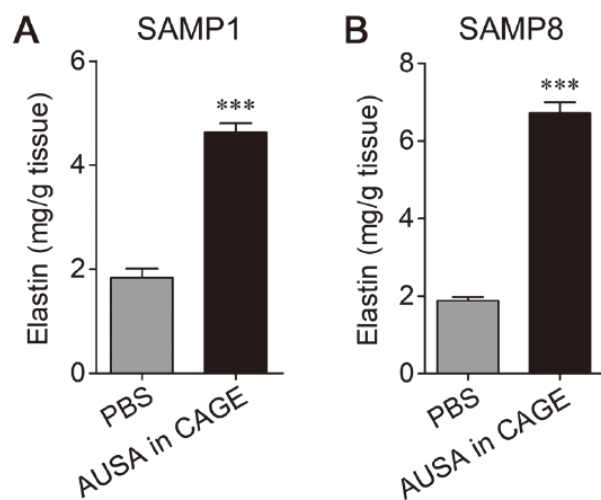


図8 シアリダーゼの経皮送達による老化促進モデルマウスの真皮におけるエラスチンの増加
(A) SAMP1 (B) SAMP8

ーゼの4つのアイソザイムの内、どのアイソザイムに起因するのかを明らかにする目的で、ラットの皮下組織におけるシアリダーゼアイソザイムの発現を比較した。Neu2 mRNAの発現量は、脂肪組織よりも真皮や筋肉などの組織で顕著に高かった(図9A-D)。一方、Neu1、Neu3、Neu4の発現量は、真皮と筋肉を含む組織よりも脂肪組織で高かった。

3. 5. Neu2の経皮投与による皮膚エラスチンの増加

腹側部における免疫組織染色において、Neu2は皮下脂肪に比べ真皮と筋肉に多く発現していた(図10A)。Neu2がエラスチン産生に及ぼす影響は不明であることから、C6ラットグリオーマ細胞で作製したラットNeu2を用いて、Neu2が皮膚のエラスチン量に及ぼす影響を検討した。Neu2の経皮投与においては、Neu2を含むCAGEをラット皮膚に塗布する方法、または、Neu2を先に皮膚に塗布し、その後CAGEを塗布する方法の2通りで試した。Neu2の塗布を1日2回、5日間行った結果、どちらの方

法でも皮膚のエラスチンレベルが上昇することが見出された(図10B)。また、皮膚のエラスチンmRNAレベルは、Neu2を適用しても有意な影響を受けなかった(図10C)。

4. 考 察

本研究では、皮膚におけるシアリダーゼの酵素活性の分布や発現するアイソザイム、加齢に伴う発現量の変化など、シアリダーゼに関する基礎的知見を得た。ラット側腹部の組織をpH7.3のBTP3-Neu5Acで染色すると、脂肪組織と比較して真皮と筋肉に強いシアリダーゼ活性が検出された。BTP3-Neu5AcはpH7.3ではシアリダーゼアイソザイムのNeu2とNeu4によって優先的に加水分解され、Neu1とNeu3によって弱く加水分解される⁶⁾。従って、pH7.3の真皮と筋肉における強いシアリダーゼ活性は、Neu2によるものと推定された。また、pH4.6におけるシアリダーゼ活性の分布は、pH7.3における分布と大きな違いはなかった。pH4.6では、BTP3-Neu5AcはNeu1とNeu3によって効率よく加水分解されるが、Neu2と

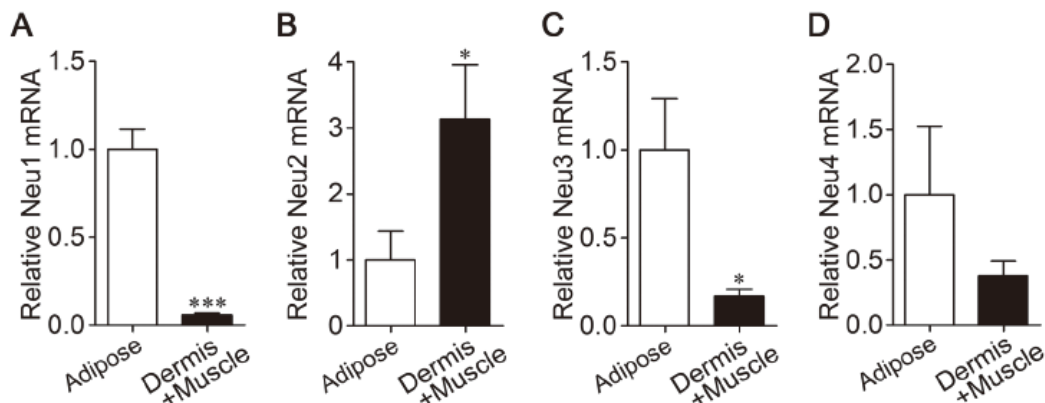


図9 皮膚におけるシアリダーゼアイソザイムの発現比較

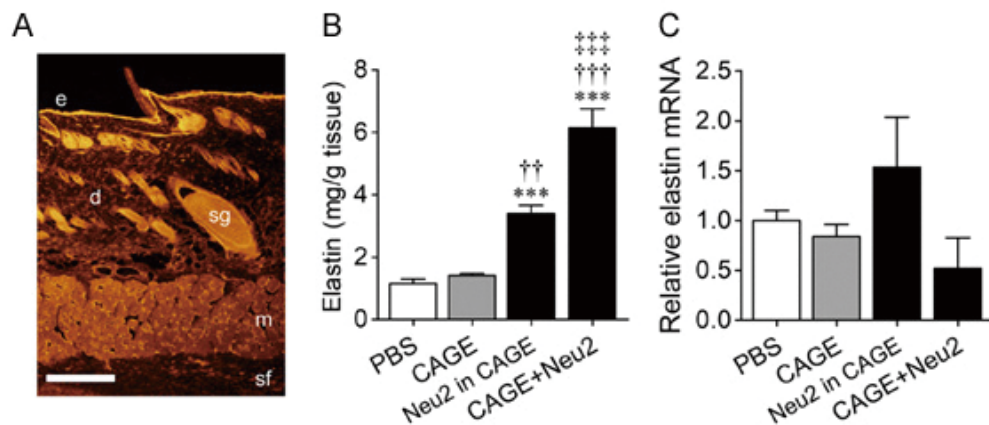


図10 Neu2の経皮投与による皮膚エラスチンの増加

(A) 皮膚におけるNeu2の発現分布(B, C) Neu2の経皮投与がエラスチン(B) やエラスチンmRNA(C)の発現に及ぼす影響

Neu4によっても分解される⁶⁾。pH4.6でも皮膚におけるシアリダーゼ活性のイメージングには主にNeu2が寄与していると思われる。

皮膚の老化は、真皮のコラーゲン、エラスチン、グリコサミノグリカンなどの質的・量的な変化に起因している。皮膚エラスチンの減少によって、皮膚の弾力性が失われる。本研究では、4MU-Neu5Acを用いてpH7.3で測定したシアリダーゼ活性が老化によって低下することを明らかにした。シアリダーゼはエラスチン集合を促進することから、加齢に伴うエラスチンの減少は、シアリダーゼ活性の低下と関係している可能性がある。

CAGEを用いてシアリダーゼを経皮投与したところ、真皮におけるシアリダーゼ活性は経皮投与後に増加した。CAGEが酵素活性を維持したまま酵素を経皮投与できることを示唆している。今回、シアリダーゼの経皮投与によって、皮膚のエラスチン量を増加させることが見いだされた。Neu1はエラスチンの集合を促進するだけでなく、エラスチン由来ペプチドの分解調節に関与することが報告されている。シアリダーゼの経皮投与によりエラスチン量が増加したことから、外因性のシアリダーゼはエラスチンの分解促進ではなく、エラスチン集合の促進に主に寄与すると考えられる。

バクテリア由来のシアリダーゼのみならず、Neu2を経皮投与することによっても皮膚のエラスチン量が増加した。エラスチン産生にはNeu1だけでなくNeu2も関参与していると考えられる。皮膚中のエラスチンmRNA量はNeu2塗布による有意な影響は見られなかった。従って、シアリダーゼによるエラスチンの増加は、ミクロフィブリルからのシアル酸脱離によるエラスチンの集合の促進によると考えられる。Neu1はリソゾーム酵素であり、至適pHは4.4-4.6である。Neu2は糖タンパク質、オリゴ糖、ガングリオシドを加水分解し、至適pHは6.0-6.5である。Neu2は細胞外の中性pHで作用するので、Neu2を経皮投与すると細胞外空間のミクロフィブリルからシアル酸が効率的に遊離すると思われる。Neu2を経皮投与した皮膚において、光老化皮膚に見られるような重度の皮膚エラストーシスは観察されなかった。しかし、シアリダーゼが皮膚エラストーシスを誘導しないことを厳密に確認するためには、より詳細に検討する必要がある。

エラスチンは、皮膚の老化に伴って減少する。加齢のほか、皮膚弛緩症や弾性線維性仮性黄色腫、Williams-Beuren症候群、肥満による皮膚障害などによって、皮膚環境が悪化するとエラスチンが減少することが明らかにされている。皮下脂肪組織の増加は、真皮エラスチンの分解を促進させる。エラスチンのターンオーバーには長い時間を要するが、シアリダーゼの経皮投与によりエラスチンを回復させることで皮膚環境が改善されることが考えられる。

5. 総括

皮膚の真皮にはNeu2に起因する強いシアリダーゼ活性があり、加齢とともに活性が低下することが示された。また、経皮輸送基剤CAGEは、シアリダーゼの酵素活性を維持したまま経皮投与できる有用性が確認された。CAGEはシアリダーゼだけでなく、様々な酵素の経皮投与に有用であると考えられる。さらに、CAGEを用いたシアリダーゼの経皮投与により、皮膚エラスチンが増加することを明らかにした。シアリダーゼの経皮投与は、エラスチンの減少によるシワや皮膚障害の改善に有用であると期待される。

(本研究により得られた成果)

・ Akira Minami, Yuka Fujita, Jun Goto, Ayano Iuchi, Kosei Fujita, Yasuyo Mikami, Mako Shiratori, Ami Ishii, Samir Mitragotri, Yasunori Iwao, Hiroaki Kanazawa, Yuuki Kurebayashi, Tadanobu Takahashi, Tadamune Otsubo, Kiyoshi Ikeda, Takashi Suzuki: Enhancement of elastin expression by transdermal administration of sialidase isozyme Neu2. *Sci. Rep.*, **11**, 3302 (2021).

(引用文献)

- 1) Minami A, Kurebayashi Y, Takahashi T, Otsubo T, Ikeda K, Suzuki T: The Function of Sialidase Revealed by Sialidase Activity Imaging Probe. *Int. J. Mol. Sci.*, **22**, (2021).
- 2) Minami A, Otsubo T, Ieno D, Ikeda K, Kanazawa H, Shimizu K, Ohata K, Yokochi T, Horii Y, Fukumoto H, Taguchi R, Takahashi T, Oku N, Suzuki T: Visualization of sialidase activity in Mammalian tissues and cancer detection with a novel fluorescent sialidase substrate. *PLoS One*, **9**, e81941 (2014).
- 3) Minami A, Shimizu H, Meguro Y, Shibata N, Kanazawa H, Ikeda K, Suzuki T: Imaging of sialidase activity in rat brain sections by a highly sensitive fluorescent histochemical method. *Neuroimage*, **58**, 34-40 (2011).
- 4) Minami A, Ishii A, Shimba S, Kano T, Fujioka E, Sai S, Oshio N, Ishibashi S, Takahashi T, Kurebayashi Y, Kanazawa H, Yuki N, Otsubo T, Ikeda K, Suzuki T: Down-regulation of glutamate release from hippocampal neurons by sialidase. *J. Biochem.*, **163**, 273-280 (2018).
- 5) Minami A, Meguro Y, Ishibashi S, Ishii A, Shiratori M, Sai S, Horii Y, Shimizu H, Fukumoto H, Shinba S, Taguchi R, Takahashi T, Otsubo T, Ikeda K, Suzuki T:

- Rapid regulation of sialidase activity in response to neural activity and sialic acid removal during memory processing in rat hippocampus. *J. Biol. Chem.*, **292**, 5645–5654 (2017).
- 6) Minami A, Saito M, Mamada S, Ieno D, Hikita T, Takahashi T, Otsubo T, Ikeda K, Suzuki T: Role of sialidase in long-term potentiation at mossy fiber-CA3 Synapses and hippocampus-dependent spatial memory. *PLoS One*, **11**, e0165257 (2016).
- 7) Minami A, Fujita Y, Shimba S, Shiratori M, Kaneko YK, Sawatani T, Otsubo T, Ikeda K, Kanazawa H, Mikami Y, Sekita R, Kurebayashi Y, Takahashi T, Miyagi T, Ishikawa T, Suzuki T: The sialidase inhibitor 2,3-dehydro-2-deoxy-N-acetylneuraminic acid is a glucose-dependent potentiator of insulin secretion. *Sci. Rep.*, **10**, 5198 (2020).
- 8) Kurebayashi Y, Takahashi T, Miura T, Otsubo T, Minami A, Fujita Y, Sakakibara K, Tanabe M, Iuchi A, Ota R, Ikeda K, Suzuki T: Fluorogenic probes for accurate in situ imaging of viral and mammalian sialidases. *ACS Chem. Biol.*, **14**, 1195–1204 (2019).