

厚生労働科学研究費補助金

創薬基盤推進研究事業

ヒトゲノムテーラーメイド研究

糖鎖プライマー法を利用した白血病等の発現糖鎖

パネル化と発現糖鎖プローブ開発による

診断・治療への応用

H18 - ゲノム - 一般 - 005

平成19年度 総括・分担研究報告書

主任研究者 藤本 純一郎

平成20（2008）年 4月

目 次

I. 総括研究報告 -----	1
糖鎖プライマー法を利用した白血病等の 発現糖鎖パネル化と発現糖鎖プローブ開発 による診断・治療への応用 -----	3
藤本 純一郎	
II. 分担研究報告 -----	15
1. 糖鎖プライマー法による糖鎖構造の解析 -----	17
佐藤 智典	
2. 血液系未分化細胞プロファイリング および抗糖鎖抗体作製 -----	27
清河 信敬	
3. 血液系未分化細胞プロファイリング および抗糖鎖抗体作製 -----	33
片桐 洋子	
4. 間葉系未分化細胞プロファイリング -----	41
梅澤 明弘	
5. 発現糖鎖解析、糖鎖修飾分子合成 および抗糖鎖抗体作製 -----	45
中島英規	
III. 研究成果の刊行に関する一覧表 -----	49
IV. 研究成果の刊行物・別刷 -----	55

I 総括研究報告書

糖鎖プライマー法を利用した白血病等の発現糖鎖パネル化と
発現糖鎖プローブ開発による診断・治療への応用

主任研究者 藤本 純一郎

総括研究報告書

糖鎖プライマー法を利用した白血病等の発現糖鎖パネル化と発現糖鎖プローブ開発による
診断・治療への応用（H18-ゲノム一般-005）

主任研究者

藤本 純一郎

国立成育医療センター研究所

副所長

研究要旨：細胞の成熟やがん化に伴い発現糖鎖構造は多様に変化し、特定の機能を発揮することが知られている。しかし細胞での発現量が微量であることに加え、構造の多様性や精製・分析の難しさ、特異性の高いプローブの不足などから、医療分野での応用は限られている。本研究では「糖鎖プライマー法」を利用して細胞に糖鎖を大量に産生させ、その構造を網羅的に解析し、白血病細胞や組織幹細胞を始めとする未分化細胞の発現糖鎖パネル化を図り、細胞のプロファイリングに利用する情報を得る。本年度はこの糖鎖プライマー法を白血病細胞をはじめとしたがん細胞やヒト骨髄由来間葉系・造血系前駆細胞などの未分化細胞・分化誘導細胞に対して適用し、LC/MSで網羅的な解析を行って発現糖鎖パネルの充実を図った。糖鎖プライマー法を使用したことで、従来の細胞から抽出した糖鎖からは同定が困難なOアセチル化シアル酸を含んだ糖鎖の同定に加え、硫酸基を持った糖鎖の同定が可能であった。骨髄由来造血系前駆細胞の単球系細胞分化誘導系ではこれまで細胞株で得られていた知見と異なる結果が得られた。B前駆細胞性急性リンパ性白血病に発現する代表的抗原CD10のもつ糖鎖構造を明らかにし、糖鎖構造の違いでCD10の持つ酵素活性が変化することを明らかにした。糖蛋白質糖鎖についてはヒドラジン分解法をもとに安全で効率よく糖蛋白質N結合型糖鎖を遊離させ、LC/MSで発現糖鎖を解析する系を確立した。今後、更に白血病細胞をはじめとする多数の未分化細胞に糖鎖プライマー法を適用し、LC/MS等で分析して発現糖鎖パネルを充実すると共に、糖蛋白質糖鎖に対する発現糖鎖パネルも充実させ、産生糖鎖を抗原として利用した優秀な抗糖鎖抗体の樹立を行い、得られた成果を小児難知性疾患の新規診断・治療法開発へ活用していく。

分担研究者

佐藤智典 慶應義塾大学理工学部 教授

清河信敬 国立成育医療センター研究所

発生・分化研究部 部長

片桐洋子 国立成育医療センター研究所

発生・分化研究部形態発生研究室 室長

梅澤明弘 国立成育医療センター研究所

生殖医療研究部 部長

中島英規 国立成育医療センター研究所

副所長室 流動研究員

A. 研究目的

本研究では、白血病細胞をはじめとする小児腫瘍細胞やヒト骨髄間葉系及び造血幹細胞を含むヒト未分化細胞が産生し発現している糖鎖の構造・機能を解明すると共に、細胞の発現糖鎖情報をパネル化して、小児腫瘍に対する新規診断・治療法開発や、ヒト幹細胞の標準化などに、臨床応用することを目指す。

糖鎖は糖脂質や糖蛋白質など複合糖質として存在し、結合している蛋白質の機能を調節したり、それ自身が機能を発揮したりして、細胞反応において重要な役割を担っていると考えられているが、その構造の多様性や精製・分析の難しさ、有用な抗体の不足などから、蛋白質に比べると医療分野での応用はごく限られている。しかし、造血幹細胞でのCD34や神経幹細胞でのSSEA-1をはじめとして、幹細胞マーカーや腫瘍マーカーとして糖鎖が用いられている点を考慮すると、糖鎖研究をより積極的に推進することが求められる。

前述のごとく、糖鎖の大量生産や構造解析の困難さ、抗体を含めた特異性の高い糖

鎖プローブ作製の困難さ、等が糖鎖研究の進展を妨げる要素となっていたが、本研究で採用する糖鎖プライマー法は糖鎖を大量に入手することの困難さを克服した方法である。この方法の長所は細胞を工場に見立てて糖鎖を培養液中に大量に分泌させ、細胞を壊すことなく、細胞から抽出するより緩和な条件で夾雑物も少なく、容易に回収できることが可能な点にある。これによってこれまで発現量が微量で難しかった細胞の糖鎖解析を網羅的に行うことが可能となり、それぞれの細胞の発現糖鎖パネルを作製するのが容易になる。そこで、この方法を応用することによって種々の小児腫瘍、その発生母体である正常組織の各分化段階の細胞、骨髄由来間葉系および造血幹細胞を含む種々の幹細胞、等の発現糖鎖情報パネル化を行い、これを小児腫瘍の新規診断法や治療法の開発、幹細胞の標準化などに応用することによって、小児腫瘍医療や再生医療へ貢献することを目的とする。

また、糖鎖プライマー法は、産生された糖鎖を抗体作製の抗原として利用するなど、2次的な利用への応用性も高い。本研究では、得られた糖鎖を化学的に修飾して抗原性を高め、一般に樹立することが難しかった糖鎖に対する優秀な抗体作製法の開発を試みる。この結果樹立された糖鎖抗体を、小児腫瘍に対する抗体療法開発や、ヒト幹細胞の標準化のための検査薬に応用することを目指す。

B. 研究方法

本研究では、1) 糖鎖プライマー法への適用を目的とした、正常未分化細胞の分化

誘導培養系の確立と、白血病等培養細胞の糖鎖プライマー法処理条件検討、2) 発現糖鎖解析、効率的プロファイリングのための基盤技術の確立、3) 各種細胞の発現糖鎖パネル化、4) 糖鎖抗体樹立、5) 発現糖鎖パネルと糖鎖抗体の細胞規格化への応用、をそれぞれ順次進めていく。本年度は昨年度行った1)と2)に加え3)の糖鎖パネルを充実させるとともにLC/MSを使用した微量検体でも適用可能な糖蛋白質糖鎖の解析技術を確立した。

使用する細胞及び培養技術として、国立成育医療センター研究所が有しているヒト白血病細胞株、凍結白血病細胞、骨髄由来造血幹細胞、ヒト間葉系幹細胞及びそれらの分化誘導技術を用いた。

糖鎖プライマー法で産生した糖鎖は培地より逆相固相カートリッジを使用して抽出した後、昨年度確立した糖鎖を高精度に分離するキャピラリー高速液体クロマトグラフィ (Cap LC) と高度な構造解析が高感度に行うことが可能なマスマスプロトメトリー (MS) を組み合わせたLC/MSを使用して解析した。糖鎖プライマーを用いて得られた発現糖鎖ライブラリーを元に発現糖鎖情報を得て、実際に細胞から抽出した脂質でも同じ糖鎖構造の糖脂質が発現しているか確認した。糖鎖プライマー由来糖鎖と細胞の糖脂質由来マスマスプロトメトリーよりそのm/zの値でエクストライオンクロマトグラムを作成し、ピーク面積を算出した。各糖鎖成分の全糖脂質の総ピーク面積に対する割合を算出し、発現糖鎖パネルを作成した。階層的クラスタリング解析にはR Stats Packageバージョン (<http://sekhon.berkeley.edu/stats/html/00Index.h>

tml) のheatmap関数を用いて行った。

CD10分子のNeutralendopeptidase (NEP) 活性については、酵素源であるB前駆細胞株N ALM6と、オリゴペプチドのC末端側に蛍光色素を結合させた合成基質Glutaryl-L-Alanyl-L-Alanyl-L-Phenylalanine-4-Methyl-Coumaryl-7-Amide (Glt-AAF-MCA)を加え、NEP特異的阻害剤であるPhosphoramidon (50 μ M) 存在/非存在下37°Cで反応を行った。一次生成物であるF-MCAのPhenylalanine残基をウシAminopeptidaseで切断し、遊離してきたMCAをexcitation 390 nm, emission 460 nmで測定した。また、Benzoyloxycarbonyl-L-Alanyl-L-Alanyl-L-Leucine p-Nitroanilide (Z-AAL-p-NA)を基質として酵素反応を行い、反応生成物を0.1 N HClで20倍に希釈してLC-MS/MSで解析した。

このように糖蛋白質糖鎖は、一種類の蛋白質であっても多様な糖鎖構造が存在する。このような糖鎖構造を明らかにするために、糖蛋白質から糖鎖のみを切り離し、LC/MSで分離・構造決定する系を確立した。充分乾燥した糖蛋白質検体に対し無水ヒドラジンを加え、100°C、10時間反応させて糖蛋白質N結合型糖鎖を遊離させた。反応終了後充分量の酢酸アンモニウム水溶液を添加し、グラファイトカーボンカラムに通して遊離糖鎖を吸着させると共にヒドラジンを除いた。無水酢酸を添加したアセトニトリル/水混合溶液で糖鎖を溶出すると共にヒドラジン分解により遊離した糖鎖中の再アセチル化を行った。遊離糖鎖は2-APなどで標識し、LC/MSで分析する際のイオン化効率向上を図った。標識後、セルロースカラムを用いて糖鎖誘導体を吸着させ、余剰標識試薬を除去してLC/MSによる分析サンプルとした。

LC/MSによる糖鎖の分離と構造解析についてはLCの分離モードに、HILIC [Hydrophilic Interaction Chromatography]を採用し、カラムには昭和電工社製ShodexNH2P50を使用して（アセトニトリル：水）の混合溶媒系で水の混合比をリニアグラディエントで増加させ、試料を分離・溶出した。MSにはBruker Daltonics社製 HCT ultra 11Sを使用し、クロマトグラフィーで分離された糖鎖を順次Electrospray ionization (ESI)へ導入して測定した。

（倫理面への配慮）

ヒト骨髄由来CD34陽性細胞は、米国Cambrex社からインフォームドコンセントを得た上で市販されているものを購入して使用したため、倫理的な配慮は特に必要ないと判断された。

本研究では、患者検体を含むヒト由来細胞および実験動物を用いた研究を予定している。患者から提供される検体ならびに臨床情報の本研究への使用については、個人情報保護に細心の注意を払い、検体を提供することによる不利益・危険性を排除するための最大限の努力を行なう。本研究自体は、ヒトゲノム・遺伝子解析研究あるいは臨床研究には該当しないが、「ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針」、「臨床研究に関する倫理指針」に準拠して行う。全ての研究は、外部委員を含めた倫理審査委員会において、その科学性ならびに倫理性についての審査を受け、同委員会の承認かつ実施機関の長の許可を得て実施する。白血病などの小児がん患者由来検体の中央診断、保存あるいは研究への使用については、すでに倫理審査を受け承認を受けている（国立成育医療センター、受付番

号75、平成15年度、受付番号126、142、以上平成16年度、受付番号188、216、218、219、以上平成18年度）。国立成育医療センターにおいては、ヒト間葉系細胞の培養と基礎研究への応用に関し既に倫理審査を受け承認を受けている（国立成育医療センター、受付番号25、26及び27、平成15年1月承認、受付番号49、平成15年10月承認、受付番号55、平成15年11月承認）。上記申請の範囲外の研究内容を実施する必要がある場合は、新規申請あるいは追加申請を行い、倫理委員会ならびに実施機関の長からの承認を経て実施する。なお、本研究では商品として市販されているヒト骨髄細胞も使用するが、これについては倫理申請の必要がないものと判断している。実験動物を用いる研究については、国立成育医療センター研究所の動物実験指針等に準拠して研究を実施する。特に、動物愛護と動物福祉の観点から実験動物使用は、目的に合致した最小限にとどめる。またその際、麻酔等手段により苦痛を与えない等の倫理的配慮をおこなう。実験者は、管理者と相互協力のもと適切な環境のもと飼育管理を行う。

C. 研究結果

1) ヒト骨髄由来造血系細胞の発現糖鎖解析

ヒト骨髄由来CD34陽性細胞をIL-3, IL-6, M-CSF, GM-CSF and Flt-3 ligand(L)添加で培養したところ、培養3週間目から、顕微鏡観察下で、接着性の細胞と浮遊系の細胞の2群に分かれた。培養3および5週間の時点でそれぞれの細胞の表現形を解析したところ、浮遊系の細胞は比較的小型で細胞質に乏しく、CD11b, CD31, CD33, CD97を発

現していたものの、その他の成熟単球抗原の発現を認めなかった。これに対して、接着系の細胞は大型で細胞質が豊富であり、浮遊系細胞で発現を認めた上記抗原に加えてCD13, CD14, CD36, CD54, CD64, CD85k, CD105, CD206,等の成熟単球抗原の発現を認めた。それぞれの分画につき、3週目と5週目で表面抗原の発現には大きな差は認めなかった。しかしサイトカイン分泌能については3週目と5週目で差を認めた。それぞれ接着性の細胞と浮遊系の細胞の2群を分離し、有機溶媒で脂質を抽出してLC/MSでGM1以降に溶出・検出されるガングリオシドの分析を行った。発現しているガングリオシドとしては、GM1, GD1a, GD3, GD2, GD1b, IV3NeuAc α -nLc4Ce, IV3NeuAc α -nLc5Cer, VI3NeuAc α -nLc6Cerの存在を確認した。得られた発現糖脂質のシグナル総和におけるそれぞれの比率を算出したところ分化段階、浮遊系、接着系で組成が異なることが明らかとなった。特に浮遊細胞では3週間分化誘導したもの、5週間培養したものにネオラクト系ガングリオシドIV3NeuAc α -nLc5Cerが発現していたが、接着系細胞ではいずれもその発現が見られなかった。一方でガングリオシドGD1aは接着した細胞で比較的多く発現が見られた。

2) ヒト骨髄由来間葉系細胞の発現糖鎖解析

ヒト間葉系細胞における未分化および細胞系譜の異なる分化誘導系をおこなう培養条件(骨、脂肪)についてほぼ確立した。また分化誘導時における糖鎖プローブを用いた糖鎖構造解析のための培養条件についても確立した。それらの条件のもとヒト間

葉系細胞(UET-13, Yub667B)に対して糖鎖プライマー(Lac-C12, GlcNac-C12)を投与して糖鎖を培地中に大量産生させ、分化過程で変化する糖鎖の回収・精製しマススペクトロメトリー等を用いた構造解析を行った。その結果、①SSEA-4タイプの糖鎖が未分化細胞特異的に検出された。②骨または脂肪分化特異的な糖鎖構造が確認できた。特に骨分化させた場合、検出されにくいとされる硫酸化糖鎖構造が確認できた。

3) ヒト神経芽腫細胞の発現糖鎖解析

神経芽腫細胞では、ほぼ全ての細胞株が共通してガングリオシドGM2を高発現していることが明らかとなった。LC-MS/MSによって細胞から抽出した糖脂質の構造解析および検出されたイオン強度の定量的解析を行った。主な2種類のセラミド(検出された質量電化比は $m/z=535.6$ と 646.6)それぞれについて検出された各ガングリオシド成分の発現量を総ガングリオシド量に対する割合を計算した。その結果、GD1a, GD2, AcGD2の割合が細胞株間で大きく異なることが明らかとなった。MYCN非増幅株3株を含むSK-N-SH, SK-N-RA, NB69, GOTO, NB9ではガングリオシドの中に占めるGD1aの割合が高くGD2およびAcGD2の発現が低いのに対し、IMR32, NB1, NB16, CHP126では逆にGD1aの発現低く、GD2およびAcGD2の発現が高かった。一方、CHP134, KP-N-NSではGD1a, GD2およびAcGD2いずれの発現も高かった。定量分析の結果からソフトウェアRのHeatmap関数を用いて全糖脂質の割合から細胞株で階層的クラスタリングを行った。結果、細胞株を大きく2つの群に分けることができた。さらに、同定され

たガングリオシド全体に占めるGD1a, GD2,

AcGD2の割合が細胞株間で大きく異なっていたことから、これら3成分の発現量をヒストグラムで比較し、階層的クラスタリングを試みることで詳細な解析を行った。この結果から糖鎖の発現様式によって神経芽腫細胞株は詳細にみると3群に分類が可能であると考えられる。また、ソフトウェアRのheatmap関数を用いて上述した3成分で階層的クラスタリングを行った結果も同様の分類結果を示した。

4) 胚性癌腫細胞の発現糖鎖解析

胚性癌腫細胞 *embryonal carcinoma cell* (EC細胞) は自己複製能と多分化能を有していること、極めてはっきりとした条件下で分化誘導できることなどから、初期胚における発生・分化の研究対象として注目され、研究が活発に行われている。EC細胞F9はその中でも非常に頻繁に使われ、発現糖鎖についても代表的なものが明らかになっている。未分化のF9細胞 (以下F9-0d) と分化誘導処理4日後から糖鎖プライマーを添加したF9細胞 (F9-4d) から得られた糖鎖伸長生成物の構造解析を行ったところ、Lac-C12を投与した培地から、グロボ系であるGb3Cer・Gb4Cer・Forssman antigen、ガングリオ系であるGM2・GM1a・GD3・GD2、ラクト・ネオラクト系であるLc3Cerと同様の糖鎖構造生成物が得られた。GlcNAc-C12を投与した培地から、ラクト・ネオラクト系糖脂質および糖タンパク質のポリN-アセチルラクトサミン骨格と同様の糖鎖構造生成物が得られた。

5) CD10Neutralendopeptidase活性に及ぼす

糖鎖の影響

小児腫瘍でもっとも頻度の高いB前駆細胞性急性リンパ性白血病に発現する代表的抗原であるCD10は糖蛋白質である。その糖鎖構造は、細胞により大きく異なる事が昨年の本研究であきらかとなっている。CD10分子はNeutralendopeptidase (NEP) 活性を持つことが知られているが、この酵素活性にCD10分子が持つ糖鎖構造が関与するかどうかを検討した。B前駆細胞株4種のCD10のNEP活性を比較したところ、グリコシル化の多様性に乏しいNALM27細胞は、インタクト細胞、膜マイクロドメイン分画、精製CD10いずれを酵素源としても他の3種より比活性が8倍高いことが明らかになった。この高い比活性は蛋白質の一次構造の違いよりも、蛋白質を翻訳後修飾している糖鎖構造の違いに起因すると考えられた。

6) 糖蛋白質N結合型糖鎖構造解析技術の確立

糖蛋白質糖鎖は、一種類の蛋白質であっても多様な糖鎖構造が存在する。このような糖鎖構造を明らかにするためには、糖蛋白質から糖鎖のみを切り離し、多様な糖鎖をクロマトグラフィーで分離することでその糖鎖構造を決定しなければならない。糖鎖を切り出す方法としてヒドラジン分解という方法があるが、ヒドラジンは非常に危険で扱いづらいことに加え、試料から除去するために特殊な装置を用意しなければならないなど非常に困難であった。本年度グラファイトカーボン固相を用い、非常に簡便で安全に余剰ヒドラジンを除去すると共に遊離糖鎖を効率よく回収する方法を確立した。一般に親水性の高い遊離糖鎖はLC/

MSで分子のイオン化法として幅広く採用されるElectro Spray Ionization (ESI) でイオン化効率が悪いという欠点がある。この欠点を克服するために糖鎖の還元末端に各種の官能基で修飾したものをそれぞれ調製し、ESI/MSで分析してイオン化効率を検討した。結果、PA化 (2-Aminopyridineで修飾) したものが最もイオン化効率が高く、高いシグナルが得られることが明らかとなった。糖蛋白質からヒドラジン分解して得られた糖鎖をPA化する際に生じる余剰PAを除く方法として、セルロース固相カートリッジを使用した方法を確立した。このように部分精製されたPA化糖鎖を何種類かのクロマトグラフィーで分離しつつMSで構造解析する系を確立した。HILICモードによる糖鎖分離では、まず標準PA化糖鎖 (M2A, M3B, M4B, M5A, M6B, M7A, M8A, M9A) をおよそ15分間隔で糖鎖の数が増えるに従い後に溶出させる条件を確立した。この分離条件でヒトIgGから得られた糖鎖を解析したところ、アシアロ画分で16種類の糖鎖ピークが確認された。現在MS/MSスペクトルから糖鎖構造を明らかにすることに着手すると同時に実際に細胞から得られた検体につき発現N結合型糖鎖の解析に着手している。

D. 考察

国立成育医療センター研究所では、ヒト白血病細胞株、凍結白血病細胞、骨髄由来細胞、ヒト間葉系幹細胞、胚性幹細胞、胚性癌腫細胞及び正常未分化細胞を多数所有しており、組織・生体からの単離培養技術も有している。さらに一部の細胞では分化誘導することも可能である。糖鎖はがん化

や細胞の成熟過程でその発現パターンが大きく変化することが知られているが、構造の多様性や精製・分析の難しさ、有用なプローブの不足などから、蛋白質に比べるとその応用はごく限られていた。本研究で採用した糖鎖プライマー法は生きた細胞をいわば糖鎖工場と見立てて培養液中に糖鎖を大量に生産させる技術である。また培養液中に分泌された糖鎖は固相抽出で比較的緩和な条件で容易に入手することができる。細胞から直接糖鎖を抽出する従来の方法で得られる糖鎖は微量で夾雑物も多く、糖脂質の場合リン脂質を除去するためアルカリ分解をする必要があり、アルカリ条件で不安定な糖鎖の情報を損なってしまうことがあった。糖鎖プライマーは生体内に存在しない人工的な糖鎖生成基質 (アクセプター) であるため、培地中に分泌された糖鎖の量が実際に細胞に発現されているものと相関しない可能性があるのが欠点である。しかしながら比較的まとまった量が回収できることに加えアクセプターが単一のため、1種類の糖鎖当たりできあがる分子の種類も1種類しかないため、細胞から直接得られる多様な糖鎖分子に比べ質量分析が比較的容易である。従って、まず糖鎖プライマー法で細胞が産生する能力のある糖鎖を網羅的に解析し、その情報を元に実際に細胞で発現している糖鎖を検証するという手法でこれまで発見することが困難であった糖鎖を同定することが可能であった。特に細胞に発現している糖脂質を解析する際、限られた量の検体を分析する場合には過剰に存在するリン脂質をアルカリ分解法で分解除去するため、この条件に不安定な糖鎖の情報が損なわれていた。糖鎖プライマー法

では、固相抽出といった緩和な条件で糖鎖分子を比較的まとまった量入手可能であることから、Oアセチルシアル酸や硫酸化糖鎖などの情報を得ることができた。

これらの方法を適用することで、これまで微量であったため困難であった糖鎖の網羅的解析がきわめて容易となり、未知の糖鎖構造を同定できる可能性もある。しかも得られた発現糖鎖構造をパネル化することで、細胞のプロファイリングに利用することも可能である。

本年度はこれら糖脂質の解析結果に加え糖蛋白質N結合型糖鎖の解析法を確立することができた。糖蛋白質糖鎖の解析には、糖蛋白質から糖鎖のみを遊離させ、クロマトグラフィーで分離して分析する手法がとられる。この糖鎖を遊離させる方法として我々はヒドラジン分解法を採用したが、この方法は毒性・爆発性のある無水ヒドラジンを使用しなければならないことに加え、反応終了後にそれを除くのに特殊な装置を使わなければならないなどの問題点があった。我々が今回導入した方法は、無水ヒドラジンにより糖鎖を遊離させた後、爆発の危険無く安全にカーボングラファイト固相を使用してヒドラジンを除くことができることが優れている。またこの方法は溶液状態の糖蛋白質ばかりでなく、SDSゲル電気泳動で分離した蛋白質のバンドについても適用可能である点も優れている。今後この手法を最大限に活用し、これまで糖脂質に限られていた糖鎖発現分子解析を糖蛋白質糖鎖へと発展させる。

糖蛋白質糖鎖の機能としてこれまで様々な報告があるが、我々は小児腫瘍でもっとも頻度の高いB前駆細胞性急性リンパ性白

血病に発現する代表的抗原であるCD10に着目し、CD10分子のNeutralendopeptidase (NEP) 活性に糖鎖構造が関与するかどうかを検討した。そこで、それぞれ異なった糖鎖構造のCD10分子を持つ、B前駆細胞株4種のNEP活性を比較した。グリコシル化の多様性に乏しいNALM27細胞は、インタクト細胞、膜マイクロドメイン分画、精製CD10いずれを酵素源としても他の3種より比活性が8倍高く、この高い比活性は、一次構造の違いよりも、糖鎖構造の違いに起因すると考えられた。

来年度以降は、LC/MSで得られたそれぞれの細胞の糖脂質糖鎖、糖タンパク質糖鎖のマスマスペクトルの結果から、多変量解析・主成分分析等の統計学的手法で、診断に有用な発現糖鎖パターンを同定することを目標とする。同時に時報に入手が困難な糖鎖に対する抗体樹立に着手する。

E. 結論

糖鎖プライマー法を用いることでこれまで検出・同定が困難だった糖鎖の発現を確認することができた。糖鎖プライマー法で得られた発現糖鎖が実際に細胞に発現していることを確認し、発現糖鎖パネルを作成した。発現糖鎖パネルをR Stats Packageバージョン(<http://sekhon.berkeley.edu/stats/html/00Index.html>)のheatmap関数を用いて階層的クラスタリング解析を行う系を確立した。糖蛋白質糖鎖N結合型糖鎖を解析する系を確立した。今後この糖蛋白質糖鎖解析系で白血病等未分化細胞の解析を進め、クラスタリング解析に着手する。

F. 健康危険情報

該当事項なし

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Pu Wang, Peixing Wu, Jinghai Zhang, Toshinori Sato, Sadako Yamagata and Tatsuya Yamagata, Positive regulation of tumor necrosis factor- α by ganglioside GM3 through Akt in mouse melanoma B16 cells, *Biochem, Biophys. Res. Commun.* 356, 438-443. 2007
- 2) D. Hu, Z. Man, P. Wang, X. Tan, X Wang, S. Takaku, S. Hyuga, T. Sato, X-S. Yao, S. Yamagata, T. Yamagata, Ganglioside GD1a negatively regulates matrix metalloproteinase-9 (MMP-9) expression in mouse FBJ cell lines at the transcriptional level, *Connective Tissue Research*, 48, 198-205. 2007
- 3) Kazutoshi Iijima, Teruhiko Matsubara, and Toshinori Sato, Selective Precipitation of Salts on the Surface of a Gel State Phosphatidylcholine Membrane, *Chem Lett.* 36, 860-861. 2007
- 4) N. Fujitani, H. Shimizu, T. Matsubara, T. Ohta, Y. Komata, N. Muira, T. Sato, and S.-I. Nishimura. Structural Transition Study of a Fifteen Amino Acid Residue Peptide Induced by GM1, *Carbohydr. Res.* 342,1895-1903 2007
- 5) M. Hashimoto, Y. Koyama, and T. Sato, In vitro Gene Delivery by pDNA/Chitosan Complexes Coated with Anionic PEG Derivatives That Have a Sugar

Side Chain, *Chem Lett.* 37, 266-267 2008

- 6) T. Sato, M. Takashiba, R. Hayashi, X. Zhu, T. Yamagata, Glycosylation of dodecyl 2-acetamide-2-deoxy- β -D-glucopyranoside and dodecyl β -D-galactopyranosyl-(1-4)-2-acetamide-2-deoxy- β -D-glucopyranoside as saccharide primers in cells, *Carbohydr. Res.* 343, 831-838. 2008
- 7) Toshinori Sato, Kenichi Hatanaka, Hironobu Hashimoto, Tatsuya Yamagata, Syntheses of oligosaccharides using cell function, *Trends Glycosci. Glycotechnol.* 19, 1-17. 2007
- 8) 佐藤 智典、グライコチップ(糖鎖アレイ)、ナノバイオ計測の実際、講談社サイエンティフィック、p42-51. 2007
- 9) M. Matsubara, T. Sato. Identification of Oligosaccharide-Recognition Molecules by Phage-Display Technology, *Trends Glycosci. Glycotechnol.*, 19, 133-145. 2007
- 10) Suzuki K, Kiyokawa N, Taguchi T, Takenouchi H, Saito M, Shimizu T, Okita H, Fujimoto J. Characterization of monocyte-macrophage-lineage cells induced from CD34+ bone marrow cells in vitro. *Int J Hematol.* 2007;85(5): 384-389.
- 11) Taguchi T, Takenouchi H, Shiozawa Y, Matsui J, Kitamura N, Miyagawa Y, Katagiri YU, Takahashi T, Okita H, Fujimoto J, Kiyokawa N. Interleukin-7 contributes to human pro-B-cell development in a mouse stromal cell-dependent

t culture system. *Exp Hematol.* 2007;35(5):1398-1407.

12) Sato B, Katagiri YU, Miyado K, Akutsu H, Miyagawa Y, Horiuchi Y, Nakajima H, Okita H, Umezawa A, Hata J-I, Fujimoto J, Toshimori K, Kiyokawa N. A novel monoclonal anti-SSEA-4 antibody, 6E2, preferentially stained interfaces between blastomeres of mouse preimplantation embryos. *Biochem Biophys Res Commun.* 2007;364(4):838-843.

13) Katagiri YU, Sato B, Miyagawa Y, Horiuchi Y, Nakajima H, Okita H, Fujimoto J, Kiyokawa N. The detergent-insoluble microdomains, rafts can be used as an effective immunogen. *Glycoconj J.* (in press)

14) Cui C, Uyama T, Miyado K, Terai M, Kyo S, Kiyono T, and Umezawa A. Human dystrophin expression in the mdx mouse, a model of Duchenne muscular dystrophy, can be conferred predominantly by "cell fusion" with human menstrual blood-derived cells. *Mol. Biol. Cell.* 18(5):1586-1594.2007

15) Nishiyama N, Miyoshi S, Hida N, Miss, Uyama T, Okamoto K, Ikegami Y, Miyado K, Segawa K, Terai M, Sakamoto M, Ogawa S, Umezawa A. The Significant Cardiomyogenic Potential of Human Umbilical Cord Blood-Derived Mesenchymal Stem Cells in Vitro. *Stem cells.* 25(8):2017-24. 2007

16) Okamoto K, Miyoshi S, Toyoda M, Hida N, Ikegami Y, Makino H, Nishiyama N, Tsuji H, Cui CH, Segawa K,

Uyama T, Kami D, Miyado K, Asada H, Matsumoto K, Saito H, Yoshimura Y, Ogawa S, Aeba R, Yozu R, Umezawa A. Working" cardiomyocytes exhibiting plateau action potentials from human placenta-derived extraembryonic mesodermal cells. *Exp Cell Res.* 313(12): 2550-62. 2007

17) Toyoda M, Takahashi H, Umezawa A. Ways for a mesenchymal stem cell to live on its own: maintaining an undifferentiated state ex vivo. *Int J Hematol.* 86(1):1-4. 2007

2. 学会発表

1) pTK/キトサン/ラクトース修飾 PEG誘導体三元複合体によるin vivoでの抗腫瘍効果、佐藤 智典、古閑 理恵子、神谷 洋平、小山 義之、松田 修、柳衛 宏宣、遺伝子・デリバリー研究会第7回シンポジウム、2007年5月18日

2) 糖修飾キトサンを用いたin vitroおよびin vivoでの遺伝子導入と発現機構の解析、近藤洋子、橋本麻由、森本稔、齋藤博之、重政好弘、柳衛宏宣、佐藤智典、遺伝子・デリバリー研究会第7回シンポジウム、2007年5月18日

3) 隠れマルコフモデルによるインフルエンザヘマグルチニン結合性ペプチドの配列パターン解析、山口 大介・島田 亜紀・大西 愛・松原 輝彦・佐藤 智典、第 56 回 高分子学会年次大会、2007年5月29-31日

4) インフルエンザウイルス広域感染阻害を目指したペプチドのヘマグルチニンとの相互作用解析、齋藤 智美・松

原 輝彦・佐藤 智典、第 56 回 高分子学会年次大会、2007年5月29-31日

5) 糖鎖結合性ペプチドとB16細胞との相互作用の解析、山下 美季、野殿 英恵、松原 輝彦、佐藤 智典、第 56 回 高分子学会年次大会、2007年5月29-31日

6) 糖鎖クラスターを認識するペプチドの結合解析、松原輝彦・飯島一智・藤谷直樹・清水弘樹・西村紳一郎・佐藤智典、第2回ホスト・ゲスト化学シンポジウム、2007年5月24日～25日（金）

7) タンパク質をカプセル化したキトサン微粒子のアニオン性高分子による被覆化、芥川 晃士、佐藤 智典、第 56 回 高分子学会年次大会、2007年5月29-31日

8) Construction of an oligosaccharide library using cells (38) Synthesis of oligosaccharides by using amino acid-linked saccharide primer, Toshinoti Sato, Lian Xue, Xingyu Zhu, Mai Murakami, Yoshimi Ide, Shuwen He, Mamoru Mizuno, Glyco19, 2007.7/15-20

9) 糖鎖集合体を認識するペプチドの構造および機能解析、松原輝彦、飯島一智、久保田博之、藤谷直樹、清水弘樹、西村紳一郎、佐藤智典、第 17 回バイオ・高分子シンポジウム、2007年 7 月 30日

10) 細胞に作らせる糖鎖ライブラリー (39) GalNAc—Thr型糖鎖プライマーによる糖鎖伸長反応、佐藤 智典、朱 性宇、カ シューブン、村上 舞、薛 蓮、金子 智典、水野 真盛、第 27 回 日本糖質学会年会、2007年8月1日

11) 細胞に作らせる糖鎖ライブラリー (40) CE/MSによる糖鎖のハイスループット解析、朱 性宇、佐藤 智典、第 27 回日本糖質学会年会、2007年8月1日

12) アニオン性高分子で被覆したpDNA/キトサン複合体の作製と遺伝子治療への応用、佐藤 智典、古閑 理恵子、神谷 洋平、楊 志宏、小山 義之、松田 修、柳衛 宏宣、第56回高分子討論会、2007年9月20日

13) 再構成膜を用いた脂質ラフト中の糖脂質集合体の構造および機能解析、松原 輝彦・飯島 一智・曾我 典弘・佐藤 智典、第56回高分子討論会、2007年9月20日

14) インフルエンザの感染を阻害する糖鎖ミミックペプチドの開発、佐藤 智典、イノベーションジャパン2007、9月13日

15) 細胞に作らせる糖鎖ライブラリー (42)糖鎖—アミノ酸型糖鎖プライマーによる糖鎖合成、佐藤 智典、薛 蓮、村上 舞、朱 性宇、何 シューブン、生命化学研究会シンポジウム、2008年1月11日

16) インフルエンザウイルス感染を阻害するヘマグルチニン結合性ペプチドの同定、齋藤 智美・松原 輝彦・佐藤 智典、第 88 回日本化学学会年会、2008年3月29日

17) 隠れマルコフモデルによるインフルエンザヘマグルチニン結合性ペプチドの配列パターン解析、山口 大介・島田 亜紀・大西 愛・松原 輝彦・佐藤 智典、第 88 回日本化学学会年会、2008年3月29日

18) 片桐 洋子, 佐藤 伴, 川崎 ナナ, 伊藤 さつき, 中島 英規, 大喜多 肇, 藤本 純一郎, 清河 信敬. ヒトB前駆細胞株に発現するCD10の糖鎖の多様性. 第27回日本糖質学会年会, 福岡, 8月1日-3日, 2007.

19) 佐藤 伴, 片桐 洋子, 宮戸 健二, 阿久津 英憲, 中島 英規, 大喜多 肇, 秦 順一, 藤本 純一郎, 梅澤 明弘, 年森 清隆, 清河 信敬. 新規抗SSEA-4単クローン抗体6E2のマウス着床前胚との反応性. 第27回日本糖質学会年会, 福岡, 8月1日-3日, 2007.

20) 中島 英規, 宮川 世志幸, 大喜多 肇, 梅澤 明弘, 清河 信敬, 藤本 純一郎. 間葉系幹細胞株UET-13のEwing肉腫原因融合遺伝子EWS-Fli1誘導による発現糖鎖の変化. 第27回日本糖質学会年会, 福岡, 8月1日-3日, 2007.

21) 田口 智子, 宮川 世志幸, 堀内 保臣, 斎藤 洋平, 竹野内 寿美, 北村 紀子, 松井 淳, 佐藤 伴, 鈴木 恭子, 斎藤 正博, 片桐 洋子, 大喜多 肇, 藤本 純一郎, 清河 信敬. oncostatin Mの造血調節作用に関するin vitroでの検討. 第69回日本血液学会総会・第49回日本臨床血液学会総会 合同開催, 横浜, 10月11日-13日, 2007.

22) 片桐 洋子, 佐藤 伴, 田口 智子, 石垣 宏仁, 伊藤 靖, 大喜多 肇, 小笠原 一誠, 藤本 純一郎, 清河 信敬. 同系腫瘍細胞及びヒト腎癌由来細胞株ACHNラフト免疫により誘導される免疫応答. 第37回日本免疫学会総, 東京, 11月20日-22日, 2007.

23) 片桐 洋子, 佐藤 伴, 川崎 ナ

ナ, 伊藤 さつき, 中島 英規, 大喜多 肇, 藤本 純一郎, 清河 信敬. ヒトB前駆細胞株に発現するCD10の糖鎖の多様性とendopeptidase活性. 第30回日本分子生物学会第80回日本生化学会大会合同大会, 横浜, 12月11日-15日, 2007.

24) 佐藤 伴, 片桐 洋子, 宮戸 健二, 阿久津 英憲, 中島 英規, 大喜多 肇, 藤本 純一郎, 梅澤 明弘, 年森 清隆, 清河 信敬. 新規抗SSEA-4単クローン抗体6E2のマウス着床前胚との反応性. 第30回日本分子生物学会第80回日本生化学会大会合同大会, 横浜, 12月11日-15日, 2007.

25) 中島 英規, 宮川 世志幸, 大喜多 肇, 佐藤 伴, 堀内 保臣, 片桐 洋子, 梅澤 明弘, 清河 信敬, 藤本 純一郎. ヒト間葉系前駆細胞を用いたEwing's family tumor発現融合遺伝子EWS/FLI1による糖脂質の変化. 第30回日本分子生物学会第80回日本生化学会大会合同大会, 横浜, 12月11日-15日, 2007.

H. 知的財産権の出願・登録状況

(予定を含む。)

1. 特許取得
該当なし
2. 実用新案登録
該当なし
3. その他
該当なし

II 分担研究報告書

1. 糖鎖プライマー法による糖鎖構造の解析

佐藤 智典

2. 血液系未分化細胞プロファイリング及び抗糖鎖抗体作製

清河 信敬

3. 血液系未分化細胞プロファイリング及び抗糖鎖抗体作製

片桐 洋子

4. 間葉系未分化細胞プロファイリング

梅澤 明弘

5. 発現糖鎖解析、糖鎖修飾分子合成及び抗糖鎖抗体作製

中島 英規

分担研究報告書

糖鎖プライマー法による糖鎖構造の解析

分担研究者 佐藤 智典 慶應義塾大学理工学部生命情報学科 教授

研究要旨：糖鎖パネルを作製するために、11種類の神経芽腫細胞および胚性癌腫細胞F9を用いて発現糖鎖の解析をLC-MS/MSを用いて行った。神経芽腫細胞においては、16種類の糖脂質が検出された。これらの中から特徴的な糖脂質3種類の発現量を用いて、細胞のクラスタリングを行うことができた。F9細胞ではLac-C12プライマーにより8種類、GlcNAc-C12プライマーにより9種類の糖鎖伸長生成物が検出され、分化による糖鎖合成の変化を検出することができた。

A. 研究目的

本研究では細胞が産生する糖鎖のカタログ化を行うために、糖鎖プライマー法を応用して細胞での発現糖鎖を解析する。糖鎖プライマーは擬似糖脂質であり、培養液中に加えると細胞内に取り込まれ、細胞内で糖鎖伸長反応を受けた後に細胞外に分泌される。よって、細胞を壊すことなく糖鎖伸長生成物を単離して構造を解析することが可能である。得られた糖鎖伸長生成物は内在性の糖鎖の種類を反映していることが明らかになっている。複数の糖鎖合成経路の基質となる糖鎖プライマーを、種々の培養細胞に与えることで、細胞で発現している多くの糖鎖を合成することができる。

本年度は神経芽腫細胞および胚性癌腫細胞を用いて発現糖鎖に関する研究を行った。

未熟神経芽細胞あるいは交感神経母細胞は胎生6週頃には神経堤から前脊椎や副腎原基の尾側に遊走し、分化・成熟し、

交感神経節や副腎髄質を形成する。神経芽腫群腫瘍はこの分化・成熟過程の異常により発生するとされている。神経芽腫は発生する部位、分化段階、そして腫瘍の悪性度の違いなど多様性に富んだ腫瘍である。この多様性を、細胞表面を覆っている糖鎖で分類できるかどうかを検討する。

胚性癌腫細胞 embryonal carcinoma cell (EC細胞) は自己複製能と多分化能を有していること、極めてはっきりとした条件下で分化誘導できること、フィーダー細胞などの特別な培養が必要ないことなどの利点があるため、初期胚における発生・分化の研究対象として注目され、研究が活発に行われている。現在、EC細胞における糖鎖研究では、主に分化における糖鎖のマーカーはいくつか存在する。しかし、従来から行われている糖鎖マーカーの探索研究では、分化過程において変化する糖鎖を網羅的に解析することは困難である。そこで、糖鎖プライマー法を用いて、新たな糖鎖マーカーの獲得を

目指す。

これらの細胞を用いて、内在性の糖脂質の検出、およびラクトースを有する糖鎖プライマー-Lac-C12およびN-アセチルグルコサミンを有するGlcNAc-C12を投与して得られる糖鎖伸長生成物の構造および発現量をLC-MS/MSにより解析した。

B. 研究方法

神経芽腫細胞での実験

ヒト神経芽腫細胞株GOTO, NB1, NB9, NB16, NB69, IMR-32, CHP126, CHP134, KP-N-NS, SK-N-SH, SK-N-RAを用いて実験を行った。

細胞にクロロホルム/メタノール=2/1 (v/v) を1 mL加えて30分間超音波照射したのち、15000 rpm, 20分間遠心分離した。上清は分取し、窒素気流下で溶媒を蒸発させた。残渣にはクロロホルム/2-プロパノール/水=7/11/2 (v/v/v) 1 mLを加えて30分間超音波照射し、15000 rpm, 20分間遠心分離し、上清を先述の抽出液と混合して乾燥させた。乾燥させた抽出物を50 mM NaCl溶液8 mLに溶解させ、活性化および平衡化したSep-Pak C18 plus逆相カートリッジに吸着させ、MilliQ 10 mLで洗浄した後、メタノールでカラムから溶出させた。遠心エバポレーターでメタノールを蒸発させたものを高性能薄層クロマトグラフィー (HPTLC) および液体クロマトグラフィー質量分析 (LC-MS/MS) のサンプルとした。

細胞から抽出した糖脂質はHPTLC plate (Silica gel 60) に展開することで分析した。糖脂質は、クロロホルム/メタノール=2/1 (v/v) に溶解し、1レーン当た

り細胞数 1.0×10^7 cellsから得られた量となるように載せ、HPTLC plateに展開した。展開溶媒にはクロロホルム/メタノール/0.2% CaCl₂ aq. = 5/4/1 (v/v/v) を用いた。展開後はHPTLC plateを十分に乾かした後、レゾルシノール塩酸試薬で酸性糖を染色し、さらにオルシノール硫酸試薬で中性糖を染色した。これをHPTLC plateに噴霧し、清浄なガラス板ではさみ、120 °Cで約20 分間加熱した。青紫色に染色されたバンドはデンストメーター (CS-9000, 島津製作所) で波長580 nmで解析した。これをHPTLC plateに噴霧し、ホットプレート上で105 °Cで加熱した。赤紫色に染色されたバンドはデンストメーターで波長540 nmで解析した。

ガングリオシドのTLC免疫染色は次ぎのように行った。糖脂質をクロロホルム/メタノール=2/1 (v/v) に溶解し、1レーン当たり細胞数 1.0×10^7 cellsから得られた量となるようにHPTLC plateに展開した。展開溶媒にはクロロホルム/メタノール/0.2% CaCl₂ aq. = 5/4/1 (v/v/v) を用いた。展開後はHPTLC plateを十分に乾燥した後、0.1% ポリイソブチルメタクリレート /シクロヘキサンに1分間浸し、1% BSA/PBSで30分間ブロッキングを行った。1次抗体を90分間反応させた。洗浄後、2次抗体として、HRP標識のウサギ抗マウスポリクローナル抗体を1時間反応させた。TLC上の糖鎖に結合した抗体はECL plus (GE Healthcare Bio-science Corp) を用いてマニュアルに従って化学発光し、LAS-1000 (Fuji Film) にて検出した。

細胞から抽出した糖脂質は順相カラム (imtakt UK-silica, 150 mm×0.3 mm)

をつないだ Agilent 1100 Series Capillary LC SystemのHPLCによって分離した。移動相はクロロホルム / メタノール / 50 mM 酢酸-トリエチルアミン (pH 4.2) = 83 / 16 / 1およびメタノール / 50 mM 酢酸-トリエチルアミン (pH 4.2) = 3 / 1を用いた。

オンラインの質量分析計は Electrospray ionization (ESI) / ion trap (IT) type mass spectrometer (HCT ultra 11S, Bruker Daltonics) を使用し、negative ion modeで測定した。測定後、対象のm/zの値でエクストライオンクロマトグラムを作成し、ピーク面積をコンパウンドリストで算出した。各糖鎖成分の全糖脂質の総ピーク面積に対する割合を算出し、発現糖鎖パネルを作成した。

階層的クラスタリング解析にはR Stats Package バージョン (<http://sekhon.berkeley.edu/stats/html/00Index.html>) のheatmap関数を用いて行った。LC/MS/MSによる糖鎖の解析結果から、糖脂質全体でのクラスタリングおよび細胞株間で大きな違いが見られた糖脂質でクラスタリング解析を行い、heatmapを作成した。

細胞のtotalRNAはQiagen RNeasy Mini Kit (Qiagen) の取り扱い説明書に従って抽出した。First-Strand cDNA Synthesis Kit (GE Healthcare Bio-science Corp) を用いて、5 μ gの全RNAからcDNAに逆転写を行った。cDNAは4倍希釈してPCR反応のテンプレートとした。使用したPCRプライマーをTable 2-1に示す。PCR反応試薬にはQIAGEN社のHotStarTaq Master Mix Kitを用いた。

F9細胞での実験

分化誘導前後のF9細胞への糖鎖プライマー投与を以下のように行った。分化誘導前後のF9細胞を細胞数 2.0×10^6 の細胞密度で播種し、接着後、DMEMで洗浄した。その後、10% Knockout Serum Replacement/DMEMに溶解させた50 μ M Lac-C12、GlcNAc-C12、GalNAc-Thr-C12を加え、37 $^{\circ}$ C、24時間培養した。培養後、糖鎖伸長生成物を含む培地を回収し、疎水性固相抽出カラムに吸着させ、10 mlの蒸留水で洗浄後、メタノール5 mlで溶出し、溶媒を減圧留去した。

内在性糖脂質は回収した細胞をPBS 30 mlで洗浄吸引後、クロロホルム/メタノール (C/M) (2/1, v/v) 2 ml更にクロロホルム/イソプロパノール/水 (7/11/2, v/v/v) 2 mlで脂質を抽出し、溶媒を減圧留去した。得られた抽出物を0.2 M KOH / メタノール中37 $^{\circ}$ Cで2時間反応させリン脂質を分解した。蒸発濃縮後蒸留水3 mlによく懸濁し、ヘキサンを2 ml加えた。ヘキサン層除去後、水層を疎水性固相抽出カラムに吸着させ、10 mlの蒸留水で洗浄後、メタノール5 mlで溶出し、溶媒を減圧留去した。

抽出した内在性糖脂質は標準糖脂質とともにHPTLCプレートにスポットし、クロロホルム/メタノール/0.1% CaCl₂ (5/4/1, v/v/v)で展開した。プレートを0.1% ポリイソブチルメタクリレート/シクロヘキサンに1分浸した後、1% BSA/PBSで30分間ブロッキングを行った。抗SPG単クローン抗体SPS-20を室温で2時間反応させ、洗浄後、HRP標識ウサギ抗マウスポリクロー

ナル抗体（1000倍希釈）と室温で1時間反応させた。TLCプレートに結合した抗体はECL plus Western blotting systemを用いた化学発光によって可視化し、LAS-1000（Fuji Film）で蛍光を検出した。

糖鎖伸長生成物は、固相カラムから溶出後、蒸発乾固した脂質をクロロホルム/メタノール（C/M）（19/1, v/v）1 mlに溶解させた。クロロホルムで平衡化したアミノカラムに吸着させ、クロロホルム1 mlで洗浄した。その後、3% AcOH+4% トリエチルアミン/メタノール 2 mlで酸性糖を溶出し、続いて、メタノール 2ml で中性糖を溶出し、溶媒を減圧留去した。乾固した中性糖と酸性糖をメタノールに再溶解し、1つにまとめ、フィルター濾過したのちに溶媒を減圧留去し、LC/MSの試料とした。

内在性糖脂質に関してはアルカリ処理後、乾固した状態の試料にメタノールを加え、フィルター濾過したのちに溶媒を減圧留去し、LC-MSの試料とした。

糖鎖プライマー由来の糖鎖伸長生成物はクロロホルム/メタノール（C/M）（9/1, v/v）100 μ l、内在性糖脂質はメタノール100 μ lに溶解させた。糖鎖伸長生成物と内在性糖脂質はAgilent 1100 Series Capillary LC Systemを用いて分離した。

ウェスタンブロッティングは以下のように行った。糖鎖プライマー投与前後の、分化誘導前(0day)と誘導後(4day)のF9細胞をPBSで洗浄しEDTA/PBSで細胞を剥離した。洗浄に用いたPBSも糖鎖伸長生成物を含む培地画分として回収した。遠心した細胞に細胞溶解液（250 mM NaCl, 50 mM HEPES pH7.4, 0.1% NP-40）を加え、

シリンジにより細胞を破砕し、4℃で1時間静置した。15000 rpmで20分間遠心し、上清を回収した。タンパク定量はBCA protein assay kitを用いた。1レーンあたり10 μ gのタンパクをSDS-PAGEで分離し、PVDF膜へ転写した。5% スキムミルク/0.05% tween 20/PBSでブロッキング後、マウスモノクローナル抗体 anti-Dab-2、anti-Oct-3（1000倍希釈）を1時間半反応させた。洗浄後、2次抗体として、HRP標識のウサギ抗マウスポリクローナル抗体（1000倍希釈）を1時間反応させた。膜上のタンパクに結合した抗体はECL plus Western blotting systemを用いて前述と同様の方法で検出した。

糖転移酵素のReal-time PCRは次のように行った。分化誘導前と、誘導後2、4日目のF9のtotal RNAはQiagen RNeasy Mini Kitを用いて抽出した。First-Strand cDNA Synthesis Kit（GE Healthcare Bio-science Corp）により、5 μ gのtotal RNAからcDNAを合成し、0.083 μ gをPCRのテンプレートとして用いた。定量的Real-time PCRはSYBR Green Master Mix（Applied Biosystems）を用い、反応産物をABI Prism 7900HT sequence detection systemにより解析した。

C. 研究結果

神経芽腫細胞により得られた糖鎖構造の解析

各細胞株の内在性ガングリオシド発現様式を比較するために、 1.0×10^7 cellsの細胞から糖脂質を抽出しHPTLCに展開後、レゾルシノールによってシアル酸を染色した。その結果、ほぼ全ての細胞株