

Fig. 14 細胞培養上清中 MMP 類の定量解析

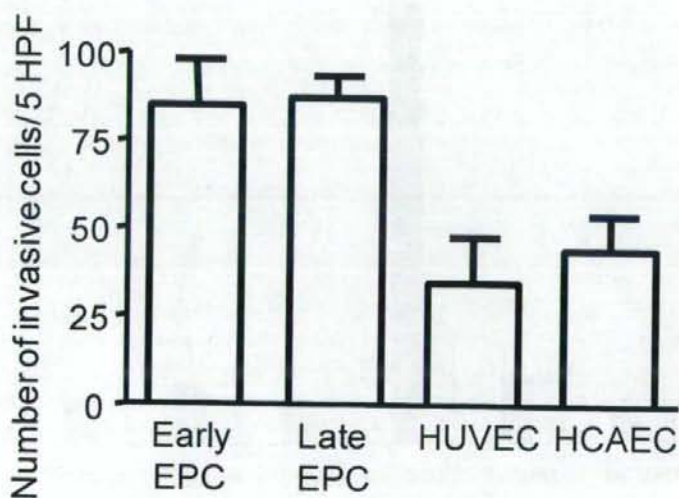


Fig. 15 マトリゲルに対する浸潤活性の比較

厚生労働科学研究費補助金  
再生医療実用化に向けた細胞組織加工医薬品の安全性・品質等の  
確保に関する基盤技術開発研究分担研究報告書  
細胞特性・品質解析技術としてのムチン型糖鎖解析技術の開発

研究分担者 早川堯夫 近畿大学薬学総合研究所  
協力研究者 掛樋一晃 近畿大学薬学部、近畿大学薬学総合研究所  
協力研究者 木下充弘 近畿大学薬学部

研究要旨：治療効果を有する特定の細胞をヒト体内に移植する先端医療である「再生医療」分野では、その実用化に向けて製品の品質、安全性等を確保する上で、原材料としての細胞、中間製品としての細胞、最終製品としての特定の細胞、混在する可能性のある細胞などの様々な特性を把握し、これらの細胞を確認・同定、識別したり、細胞の品質を管理するための方法論の確立が急務となっている。そこで、細胞のタンパク質や糖鎖を迅速、簡便、かつ特異的・定量的に解析、識別することができれば、細胞の特性・品質を管理し、再生医療を発展させる重要な基盤技術として期待できる。本研究では細胞の糖タンパク質糖鎖解析技術を再生医療実用化のための細胞特性解析技術の1つとして応用することを検討した。具体的には、ムチン型糖鎖の比較糖鎖プロファイリング技術を開発し、これを10種類のヒト培養細胞に適用し、細胞特性解析技術等としての有用性について検証した。

#### A. 研究目的

バイオテクノロジー技術を応用する医学・薬学研究の最前線では、ヒトゲノム情報の解読完了後、ゲノム情報から得られるタンパク質の構造と機能の解析が重視されている。生体内タンパク質の多くは翻訳後に糖鎖修飾を受ける場合が多い。タンパク質に結合した糖鎖は、生体内で様々な生理現象に関連することも明らかにされつつあり、我が国でも糖鎖研究はポストゲノム研究における最も重要な課題の1つと位置付けられている。

治療効果を有する細胞をそのまま、あるいは原料となる細胞から増殖、薬剤処理、遺伝子改変、分化などの加工を行って治療目的に叶う細胞を得て体内に移植したり、ヒト体内に増殖・分

化能を有する細胞を移植するなどの「再生医療」分野でも、その技術の実用化に向けて、製品の品質、安全性等を確保する上で、原材料としての細胞、中間製品としての細胞、最終製品としての特定の細胞、あるいは混在する可能性がある細胞の様々な特性を把握し、これらの細胞を確認・同定、識別したり、細胞の品質を管理する方法論の確立が急務となっている。ここでも細胞の糖鎖を迅速、簡便、かつ特異的・定量的に解析、識別する技術が開発できれば、各細胞の特性把握、品質管理、ひいては製品の品質、安全性確保のための重要な基盤技術の1つになると期待される。

本研究では細胞の糖タンパク質糖鎖を定量的に解析するための技術を開発



し、それらの技術を 10 種類の各種ヒト培養細胞のムチン型糖鎖の比較糖鎖プロファイリングへ適用し、細胞特性解析技術等としての有用性について検証した。

## B. 研究方法

### B.1 ムチン型糖鎖を含む糖ペプチド分画の調製

コンフルエント状態の細胞 ( $1 \sim 5 \times 10^7$  cells) を回収し、2%プロテアーゼインヒビターを含む 5 mM Tris-HCl 緩衝液 (pH 8.0, 0.5 ml) 中氷冷下で懸濁し 20 分放置した。次に 2% Triton X-100 を含む同緩衝液 (0.5 ml) を加えて懸濁し、グラスホモジナイザーで約 7 分間ホモジナイズし、8000 rpm で遠心分離後の上清を回収し減圧乾固し、細胞由来可溶性分画とした。可溶性分画に 80% エタノールを加え 15000 rpm で遠心分離した。上清を除き沈殿に 80% エタノール (1 ml) を加えて 2 回洗浄し沈殿を回収した。得られた沈殿にアセトンを加え 15000 rpm で遠心分離し、沈殿を凍結乾燥し細胞由来タンパク質とした。凍結乾燥物を 50 mM Tris-HCl 緩衝液 (pH 8.0, 0.2 ml) に懸濁し、プロナーゼ (50  $\mu$ g) を加え 37  $^{\circ}$ C で 24 時間反応した。反応後、反応液を沸騰水浴中で 10 分間煮沸し、遠心分離後の上清に 2M  $\text{NaBH}_4$  (500  $\mu$ L) を加え、室温で 30 分間インキュベートした。反応液に氷酢酸を注意深く滴下し限外ろ過フィルター (MWCO 5000) を用いて脱塩し、フィルター上部をムチン型糖ペプチド分画として回収した。

### B.2 高速糖鎖自動切断装置によるムチン型糖鎖の遊離

装置は当研究室で開発した O-結合型

### 糖鎖自動切り離し装置

(AutoGlycoCutter-2 (AGC-2): 島津製作所) を使用した。糖鎖切り離しのためのアルカリ溶液として 0.5 M 水酸化リチウム水溶液を用い、糖鎖遊離反応温度は 45 $^{\circ}$ C とし、反応時間は 3 分で行った。細胞から得られた糖ペプチド分画の水溶液 (50  $\mu$ l) を AGC-2 に導入し、得られたムチン型糖鎖を回収し凍結乾燥した。

### B.3 ムチン型糖鎖の 2-アミノ安息香酸 (2AA) による蛍光標識

上記操作により遊離されたムチン型糖鎖の凍結乾燥物に 2AA および  $\text{NaBH}_3\text{CN}$  をそれぞれ 3% の濃度で含む 2% ホウ酸/4% 酢酸ナトリウム/メタノール溶液 (100  $\mu$ l) を加えて 80 $^{\circ}$ C で 1 時間加温した。反応後 Sephadex LH-20 のゲルろ過クロマトグラフィーにより最初に溶出される蛍光性画分を回収し細胞由来の糖鎖とした。

### B.4 セロトニンアフィニティークロマトグラフィーによるムチン型糖鎖の分画

ポンプには JASCO PU-980 型、検出器には JASCO FP-920 型蛍光検出器を使用し、流速 0.5 mL/min で分析した。カラムは LA-Serotonin (Japan Oil Mills, 4.6 x 150 mm) を用い、カラム温度は 25  $^{\circ}$ C とした。検出は励起波長 (Ex) 350 nm、蛍光波長 (Em) 425 nm により行った。移動相の溶液 A には水、溶液 B には 50 mM 酢酸アンモニウム水溶液を用いた。グラジエント条件は、試料注入後 2 分間溶出液 B 5% とし、溶出液 B が 37 分後に 75% となるように直線グラジエント溶出を行い、その後 10 分間で溶出液 B が 100% となるようにした。

### B.5 順相分配型 HPLC によるムチン

## 型糖鎖の分析

カラムには Shodex NH2P-50 4E (4.6 mm x 250 mm, 昭和電工) を用い、溶離液 A を 2% CH<sub>3</sub>COOH/CH<sub>3</sub>CN、溶離液 B に 5% CH<sub>3</sub>COOH, 3% Triethylamine/H<sub>2</sub>O を用いた。溶出は 70% の溶離液 A によりあらかじめ平衡化した後、80 分で溶離液 B が 95% となるように直線グラジエント溶出を行った。また、検出は励起波長 350 nm、蛍光波長 425 nm で蛍光検出した。分離された糖鎖は Voyager DE-PRO (Applied Biosystems 製) を用い、2,5-dihydroxybenzoic acid (DHB) を試料マトリックスとしてリニア/ネガティブイオンモードにより測定した。

## C. 研究結果

コアタンパク質の Ser/Thr 残基に結合する O 結合型糖鎖の解析は、アルカリ還元法により O 結合型糖鎖を遊離し、HPLC や MS により解析する方法が一般的である。しかしながらアルカリ還元法では、糖鎖の遊離に数十時間を要し、得られる糖鎖は糖アルコールとなるため高感度検出のための誘導体化が不可能であり、N 型糖鎖の解析に比べ研究は著しく遅れている。我々は O 結合型糖鎖の解析における問題点を解決するため、誘導体化が可能なヘミアセタール構造を有する O 結合型糖鎖を数分以内に得ることができる高速糖鎖自動切断装置 "AutoGlycoCutter (AGC)" を開発した。本研究では、AGC により得られた細胞中のムチン型糖鎖を蛍光標識後、セロトニンアフィニティークロマトグラフィー及び順相分配型 HPLC を用いてムチン型糖鎖のプロファイリングを行った。

最初に 4 種類の血球系癌細胞および膵臓癌細胞 2 種 (PANC1、BxPC3)、大腸癌細胞 2 種 (LS174T、HCT15)、胃癌細胞 2 種 (MKN45、MKN7) について、 $1 \times 10^6$  細胞当りで発現するムチン型糖鎖量を比較した。結果を Fig.1 に示す。今回実験に使用した 4 種類の血球系癌細胞のムチン型糖鎖の含量は 3000 pmol/ $1 \times 10^6$  cell であり、上皮系細胞に比べムチン型糖鎖の含量は低かった。一方、上皮系細胞 6 種のうち、LS174T、MKN45 は血球系癌細胞の 10 倍以上のムチン型糖鎖が発現し、細胞の種類によって発現するムチン型糖鎖の含量は大きく異なることがわかった。

次に各細胞に発現するムチン型糖鎖を比較した結果を Fig.2 に示す。4 種類の血球系癌細胞では、30 分前後に観察される Sialyl-T

(NeuAc $\alpha$ 2-3Gal $\beta$ 1-3GalNAc, K-1, U-1, J-1, H-4) と 72 分前後に観察される Disialyl-T

(NeuAc $\alpha$ 2-3Gal $\beta$ 1-3[NeuAc $\alpha$ 2-6]GalNAc, K-3, U-3, J-5, H-14) が主要なムチン型糖鎖であることがわかった

(Table1)。また、前骨髄性白血病細胞 (HL60) については、Sialyl-T と

Disialyl-T 以外に 22 分~30 分付近および 40 分~50 分の間にムチン型糖鎖の還元末端 GalNAc の 6 位に

N-acetylglucosamine が付加した Core2 構造を基本骨格とする糖鎖が観察された (Table1)。

上皮系癌細胞に含まれるムチン型糖鎖のプロファイルについて比較を行った結果を Fig.3 に示す。6 種類のうち膵臓癌細胞 PANC1 と BxPC3、胃癌細胞 MKN7 では血球系癌細胞に似たプロファイルを示し、Sialyl-T と Disialyl-T が



主要なムチン型糖鎖であった。一方、他の癌細胞については、複雑な糖鎖プロファイルを示し、多種多様なムチン型糖鎖の存在が伺えた。次に、各癌細胞に含まれるムチン型糖鎖を詳細に解析するため、セロトニンアフィニティークロマトグラフィーによりムチン型糖鎖を非還元末端のシアル酸残基数の違いに基づき分画し、各分画についてMALDI-TOF MSを用いて解析した

(Fig.4)。膵臓癌細胞 PANC1 では、モノシアロ分画 (P-2) には Sialyl-T、ジシアロ分画 (P-4) には Disialyl-Tのみが観察された (Fig.5)。一方、BxPC3 ではモノシアロ糖鎖の含量が最も高く、PANC1 と同様に主要なムチン型糖鎖は Sialyl-T と Disialyl-T であったが、アシアロ分画 (B-1)、モノシアロ分画 (B-2)、ジシアロ分画 (B-3 and -4) のいずれにも

R-Gal $\beta$ 1-3(R-Gal $\beta$ 1-GlcNAc $\beta$ 1-6)GalNAc のムチン Core2 構造を基本骨格として持つ糖鎖も観察された (Table2)。

大腸癌細胞 LS174T は 6 種類の細胞の中で最も多くの種類のムチン型糖鎖を含み、全分画で計 37 種類のムチン型糖鎖を確認できた (Fig.6 and Table3)。LS174T 中のムチン型糖鎖は

R-Gal $\beta$ 1-3(R-Gal $\beta$ 1-GlcNAc $\beta$ 1-6)GalNAc のムチン Core2 構造を骨格とし、

Gal $\beta$ 1-GlcNAc $\beta$ 1-6 側鎖上に LacNAc (Gal $\beta$ -GlcNAc) が伸張した糖鎖が多く、さらにフコースあるいは硫酸基によって修飾を受けた糖鎖も観察された (Table3)。一方、HCT15 は 6 種類の中で最もムチン型糖鎖含量が低かったが、

Sialyl-T と Disialyl-T の他、Core2 構造を骨格にもつムチン型糖鎖とそれらに硫酸基が付加した糖鎖も観察された

(Table3)。

胃癌細胞のうち MKN45 はジシアロ糖鎖 (M-4) が全体の 60% 以上を占め、さらに他の細胞では観察されなかったトリシアロ糖鎖 (M-5) も多く観察された (Table4)。MKN7 には Core2 構造を骨格にもつムチン型糖鎖も含量は低いが見られた (Fig.7 and Table4)。HCT15 は 6 種類の中で最もムチン型糖鎖含量が低かったが、Sialyl-T と Disialyl-T の他、Core2 構造を骨格にもつムチン型糖鎖とそれらに硫酸基が付加した糖鎖も観察された (Table4)。MKN45 のジシアロ分画 (M-4) およびトリシアロ分画 (M-5) に含まれるムチン型糖鎖は LS174T と同様に LacNAc (Gal $\beta$ -GlcNAc) を数残基持つポリラクタサミン型糖鎖であると考えられる高分子量の糖鎖が多く観察されたが、LS174T とは異なりフコースや硫酸基で修飾された糖鎖は全く観察されなかった (Table4)。また、MKN45 にはアルカリを用いた糖鎖の遊離時に生じる R-Gal 側鎖の分解物として、LacNAc を 1~6 単位含む分解物糖鎖が観察されたことから、

R-Gal $\beta$ 1-3(NeuAc $\alpha$ 1-6)GalNAc の Gal $\beta$ 1-3 側鎖に 2 本の LacNAc 鎖が伸張したこれまで殆ど見出されなかった糖鎖であると考えられた。

一方、MKN7 はモノシアロ糖鎖が全体の約 75% を占め、主要なムチン型糖鎖は Sialyl-T と Sialyl-Tn (NeuAc $\alpha$ 2-6GalNAc) であったが LacNAc を 1 残基もつ Core2 タイプの糖鎖も観察された (Table4)。

#### D. 考察

本研究では細胞の糖タンパク質糖鎖解析を再生医療実用化のための細胞特性解析技術として応用するため、ムチン型糖鎖の比較糖鎖プロファイリング技術を開発し、10種類のヒト培養細胞をモデルにムチン型糖鎖の解析へと応用した。血球系培養細胞に含まれるムチン型糖鎖については、上皮系培養細胞に比べ糖鎖含量が低く、何れの細胞でも主要なムチン型糖鎖は Sialyl-T と Disialyl-T であったが、HL60 ではシアル酸やフコースにより修飾を受けたムチン Core2 構造を持つ糖鎖も観察された。一方、今回使用した6種類の上皮系培養細胞については、LS174T と MKN45 では LacNAc (Gal $\beta$ -GlcNAc) を数残基持つポリラクトサミン型糖鎖が豊富に含まれ、培養細胞のムチン型糖鎖は細胞の種類、分化度によって大きく異なることがわかった。また、MKN45 ではムチンコア GalNAc の Gal $\beta$ 1-3 側鎖と Gal $\beta$ 1-GlcNAc $\beta$ 1-6 側鎖の両方に LacNAc が伸張したポリラクトサミン型糖鎖と考えられる糖鎖を発見した。このような2分岐型の高分子量ムチン型糖鎖についてはこれまでに報告例がなく、今後タンデム MSMS 解析技術などを応用してより詳細な解析が必要である。

本研究により、これまで高感度分析が困難であり、糖鎖解析に1週間以上を要していたO結合型糖鎖の解析を3日以内に完了する技術を開発できた。また、生体試料中に存在する微量の糖鎖を網羅的かつ定量的に解析できることも判明した。さらに、各種細胞間でムチン型糖鎖の糖鎖プロファイルは明確に異なることも判明した。また、あ

る特定細胞には特異的なムチン型糖鎖が存在することも明らかになった。これらの結果は、本技術が、ムチン型糖鎖の糖鎖プロファイルという観点から、各細胞の特性解析、同定・確認、細胞間の差異、品質管理、細胞の機能と細胞を構成する糖タンパク質の関係、さらには各種疾患における原因糖鎖や疾患マーカーの探索など、きわめて広範囲に応用できる可能性を示している。再生医療の実用化においては、製品の品質、安全性を確保する上で、原材料としての細胞、中間製品としての細胞、最終製品としての特定の細胞、あるいは混在する可能性のある細胞の様々な特性を把握し、これらの細胞を、同定・確認、識別したり、細胞の品質を管理するための迅速、簡便、かつ特異的・定量的な方法の確立が必要不可欠である。細胞のムチン型糖鎖プロファイルを分析する本技術は、そのような条件を充たし、再生医療実用化研究を推進し、支える基盤技術として期待できる。

#### E. 研究発表

##### 1. 論文発表

Yamada K, Kinoshita M, Hayakawa T, Nakaya S, Kakehi K

Comparative studies on the structural features of O-glycans between leukemia and epithelial cell lines.

*J. Proteome Res.* 2009, *in press*

##### 2. 学会発表

###### Ion-pair

Chromatography/ESI-IT-TOF MS を用いるグリコサミノグリカン類の構造解析

木下充弘、梶 直孝、劉 人慈、山田  
佳太、早川堯夫、掛樋一晃

第 28 回日本糖質学会 つくば

ヒト血清糖タンパク質糖鎖の網羅解  
析：糖鎖バイオマーカーの可能性

山田佳太、渡部沙木絵、大西康太、山  
本晃祐、木下充弘、森嶋祥之、早川堯  
夫、掛樋一晃

第 28 回日本糖質学会 つくば

キャピラリー電気泳動を用いる O-結  
合型糖鎖の高速プロファイリング

山田佳太、木下充弘、米澤 傑、早川  
堯夫、掛樋 一晃

第 28 回日本糖質学会 つくば

ヒト血清糖タンパク質糖鎖の網羅解  
析：糖鎖バイオマーカーの可能性

山田佳太、渡部沙木絵、大西康太、山  
本晃祐、木下充弘、森嶋祥之、早川堯  
夫、掛樋一晃

BMB2008 横浜



Table 1. O-Glycans found in leukemia cell lines

Structure and monosaccharide compositions	Molecular ions	Peak ID	Relative abundance (%)		
			K562	U937	Jurkat HL-60
<b>Asialo glycan</b>					
Gal $\beta$ 1-3(Gal $\beta$ 1-4GlcNAc $\beta$ 1-6)GalNAc-2AA <sup>#A2</sup>	869(+)	H-1			4.44
<b>Monosialo glycans</b>					
NeuAc $\alpha$ 2-3Gal $\beta$ 1-3GalNAc-2AA <sup>#MS1</sup> (Sialyl T antigen)	795(+)	K-1, J-1, H-4	U1, 32.3	36.6	20.5
NeuAc $\alpha$ 2-6GalNAc-2AA (Sialyl Tn antigen)	633(+)	H-7, J-2			28.9
NeuAc $\alpha$ 2-3Gal $\beta$ 1-3(GlcNAc $\beta$ 1-6)GalNAc-2AA <sup>#MS2</sup>	997(+)	H-3			4.24
Gal $\beta$ 1-3(Gal $\beta$ 1-4GlcNAc $\beta$ 1-6)GalNAc-2AA + NeuAc <sup>#MS3</sup>	1159(-)	H-6			4.26
NeuAc $\alpha$ 2-3Gal $\beta$ 1-3(GlcNAc $\beta$ 1-6)GalNAc-2AA + Fuc	1143(-)	H-2			2.08
Gal $\beta$ 1-3(Gal-(Fuc)GlcNAc $\beta$ 1-6)GalNAc-2AA + NeuAc <sup>#MS4</sup>	1305(-)	H-5			2.26
<b>Disialo glycans</b>					
NeuAc $\alpha$ 2-3Gal $\beta$ 1-3(NeuAc $\alpha$ 2-6)GalNAc-2AA <sup>#DS1</sup> (Disialyl T antigen)	1085(-)	K-3, J-5, H-14	U-3, 30.7	30.1	12.9
NeuAc $\alpha$ 2-3Gal $\beta$ 1-3(NeuAc $\alpha$ 2-3Gal $\beta$ 1-4GlcNAc $\beta$ 1-6)GalNAc-2AA <sup>#DS2</sup>	1450(-)	J-4, H-13			10.7
NeuAc $\alpha$ 2-3Gal $\beta$ 1-3(NeuAc $\alpha$ 2-3Gal $\beta$ 1-4(Fuca1-3)GlcNAc $\beta$ 1-6)GalNAc-2AA	1596(-)	H-12			0.14
NeuAc $\alpha$ 2-3Gal $\beta$ 1-3(NeuAc $\alpha$ 2-3Gal $\beta$ 1-4GlcNAc $\beta$ 1-3Gal $\beta$ 1-4GlcNAc $\beta$ 1-6)GalNAc-2AA <sup>#DS3</sup>	1815(-)	H-10			1.49
NeuAc $\alpha$ 2-3Gal $\beta$ 1-3(NeuAc $\alpha$ 2-3Gal $\beta$ 1-4GlcNAc $\beta$ 1-3Gal $\beta$ 1-4(Fuca1-3)GlcNAc $\beta$ 1-6)GalNAc-2AA <sup>#DS4</sup>	1961(-)	H-10			1.49
NeuAc-Gal $\beta$ 1-3(NeuAc-(Gal-GlcNAc) <sub>2</sub> -Gal $\beta$ 1-4GlcNAc $\beta$ 1-6)GalNAc-2AA <sup>#DS6</sup>	2180(-)	H-9			1.11
NeuAc-Gal $\beta$ 1-3(NeuAc-(Gal-GlcNAc) <sub>3</sub> -Gal $\beta$ 1-4GlcNAc $\beta$ 1-6)GalNAc-2AA <sup>#DS9</sup>	2545(-)	H-8			2.13
<b>Degradation product</b>					
NeuAc $\alpha$ 2-3Gal-2AA	592(+)	K-2, J-3, H-11	U-2, 17.3	21.2	20.6
					23.7

We showed ms/ms data for the glycan with # marks in supporting information. The information is available free of charge via the Internet at <http://pubs.acs.org>. The structures in blue are confirmed according to the analogous consideration on the structures of higher / lower series of O-glycans. The structures in red are not assigned in the present study, because we could not observe good MS<sup>n</sup> data.



Table 2. O-Glycans found in pancreatic cancer cell lines

O-glycans observed in PANC1	Molecular ions	O-glycans observed in BxPC3	Molecular ions
Asialo fraction(peak P-1): 0%		Asialo fraction (Peak B-1):6.0%	
		Galβ1-3GalNAc-2AA	504 (+)
		Galβ1-3(GlcNAcβ1-6)GalNAc-2AA#A1	707 (+)
		Galβ1-3(Galβ1-4GlcNAcβ1-6)GalNAc-2AA#A2	869 (+)
		Galβ1-3(GlcNAcβ1-3Galβ1-4GlcNAcβ1-6)GalNAc-2AA#A4	1093(+)
		Galβ1-3(Gal-GlcNAc-Galβ1-4GlcNAcβ1-6)GalNAc-2AA#A5	1255(+)
Monosialo fraction (Peak P2, P3): 63%		Monosialo fraction (Peak B-2): 70%	
NeuAcα2-3Galβ1-3GalNAc-2AA#MS1 (Sialyl T antigen)	795(+)	NeuAcα2-3Galβ1-3GalNAc-2AA#MS1 (Sialyl T antigen)	795(+)
		Galβ1-3(Gal-GlcNAcβ1-6)GalNAc-2AA + NeuAc1#MS3	1159(-)
		Galβ1-3(Gal-GlcNAc-Gal-GlcNAcβ1-6)GalNAc-2AA + NeuAc1#MS5	1524(-)
		Galβ1-3 (Gal-GlcNAc-Gal-(Fuc-) GlcNAcβ1-6) -GalNAc-2AA + NeuAc1#MS6	1670(-)
		Galβ1-3((Gal-GlcNAc)2-Gal-GlcNAcβ1-6)GalNAc-2AA + NeuAc1#MS8	1889(-)
		Galβ1-3(((Gal-GlcNAc)2-Gal-(Fuc-)GlcNAcβ1-6) -GalNA-2AA + NeuAc1#MS9	2035(-)
		Galβ1-3((Gal-GlcNAc)3-Gal-GlcNAcβ1-6)GalNAc-2AA + NeuAc1#MS10	2254(-)
		Galβ1-3((Gal-GlcNAc)3-Gal-(Fuc-)GlcNAcβ1-6) GalNAc-2AA + NeuAc1#MS11	2400(-)
		Galβ1-3((Gal-GlcNAc)4-Gal-GlcNAcβ1-6)GalNAc-2AA + NeuAc1#MS12	2619(-)
		Galβ1-3((Gal-GlcNAc)4-Gal-(Fuc-)GlcNAcβ1-6)GalNAc-2AA + NeuAc1#MS13	2765(-)
Disialo fraction (Peak P4): 37%		Disialo fraction (Peak B3, B4, B5): 24%	
NeuAcα2-3Galβ1-3(NeuAcα2-6)GalNAc-2AA#DS1 (Disialyl T antigen)	1085(-)	NeuAcα2-3Galβ1-3(NeuAcα2-6)GalNAc-2AA#DS1 (Disialyl T antigen)	1085(-)
		NeuAc2Hex1HexNAc4Hex1-2AA + Gal-Galβ1-3(NeuAc-Gal-GlcNAcβ1-6)GalNAc-2AA#DS2	1231(-)
			1450(-)

NeuAc-Gal $\beta$ 1-3(NeuAc-Gal-GlcNAc-Gal-GlcNAc $\beta$ 1-6)GalNAc-2AA <sup>#DS3</sup>	1815(-)
NeuAc-Gal $\beta$ 1-3(NeuAc-Gal-GlcNAc-Gal-(Fuc)GlcNAc $\beta$ 1-6)GalNAc-2AA <sup>#DS4</sup>	1961(-)
NeuAc-Gal $\beta$ 1-3(NeuAc-(Gal-GlcNAc) <sub>2</sub> -Gal-GlcNAc $\beta$ 1-6)GalNAc-2AA <sup>#DS6</sup>	2180(-)
NeuAc-Gal $\beta$ 1-3(NeuAc-(Gal-GlcNAc) <sub>2</sub> -Gal-(Fuc)GlcNAc $\beta$ 1-6)GalNAc-2AA <sup>#DS7</sup>	2326(-)
NeuAc-Gal $\beta$ 1-3(NeuAc-(Gal-GlcNAc) <sub>3</sub> -Gal-GlcNAc $\beta$ 1-6)GalNAc-2AA <sup>#DS9</sup>	2545(-)
NeuAc-Gal $\beta$ 1-3(NeuAc-(Gal-GlcNAc) <sub>3</sub> -Gal-(Fuc)GlcNAc $\beta$ 1-6)GalNAc-2AA	2691(-)
NeuAc-Gal $\beta$ 1-3(NeuAc-(Gal-GlcNAc) <sub>4</sub> -Gal-GlcNAc $\beta$ 1-6)GalNAc-2AA <sup>#DS10</sup>	2910(-)
NeuAc-Gal $\beta$ 1-3(NeuAc-(Gal-GlcNAc) <sub>4</sub> -Gal-(Fuc)GlcNAc $\beta$ 1-6)GalNAc-2AA	3056(-)
<u>Degradation product</u>	
NeuAc $\alpha$ 2-3Gal-2AA	592(+)

We showed ms/ms data for the glycan with # marks in supporting information. The information is available free of charge via the Internet at <http://pubs.acs.org>. The structures in blue are confirmed according to the analogous consideration on the structures of higher / lower series of *O*-glycans. The structures in red are not assigned in the present study, because we could not observe good MS<sup>n</sup> data.



Table 3. O-Glycans found in colon cancer cell lines

O-glycans observed in LSI74T	Molecular ions	O-glycans observed in HCT-15	Molecular ions
<u>Asialo fraction(peak L-1): 25.6%</u>			
Galβ1-3GalNAc-2AA	504 (+)	Asialo fraction (Peak H-1): 13.8%	
GlcNAc-GalNAc-2AA	545 (+)	GlcNAc-GalNAc-2AA	545 (+)
Galβ1-3(GlcNAcβ1-6)GalNAc-2AA <sup>#A1</sup>	707 (+)	Fuc-Galβ1-3GalNAc-2AA	649(+)
Galβ1-3(Gal-GlcNAcβ1-6)GalNAc-2AA <sup>#A2</sup>	869 (+)	Galβ1-3(GlcNAcβ1-6)GalNAc-2AA <sup>#A1</sup>	707 (+)
Galβ1-3(Gal-(Fuc-)GlcNAcβ1-6)GalNAc-2AA <sup>#A3</sup>	1014(-)	Galβ1-3(Gal-GlcNAcβ1-6)GalNAc-2AA <sup>#A2</sup>	869 (+)
Galβ1-3(GlcNAc-Gal-GlcNAcβ1-6)GalNAc-2AA <sup>#A4</sup>	1071(-)		
Galβ1-3(Gal-GlcNAc-Gal-GlcNAcβ1-6)GalNAc-2AA <sup>#A5</sup>	1233(-)		
Galβ1-3(Gal-GlcNAc-Gal-(Fuc-)GlcNAcβ1-6)GalNAc-2AA <sup>#A6</sup>	1379(-)		
Galβ1-3(GlcNAc-Gal-GlcNAc-Gal-GlcNAcβ1-6)GalNAc-2AA <sup>#A7</sup>	1436(-)		
Galβ1-3((Gal-GlcNAc) <sub>2</sub> -Gal-GlcNAcβ1-6)GalNAc-2AA <sup>#A8</sup>	1598(-)		
Galβ1-3((Gal-GlcNAc) <sub>2</sub> -Gal-(Fuc-)GlcNAcβ1-6)GalNAc-2AA <sup>#A9</sup>	1744(-)		
<u>Monosialo fraction (Peak L-2): 37.1%</u>			
Galβ1-3(Gal-GlcNAcβ1-6)GalNAc-2AA + NeuAc <sub>1</sub> <sup>#MS3</sup>	1159(-)	Monosialo fraction (Peak H-2): 23.8%	
Galβ1-3(Gal-(Fuc-)GlcNAcβ1-6)GalNAc-2AA + NeuAc <sub>1</sub> <sup>#MS4</sup>	1305(-)	NeuAc <sub>2</sub> -3Galβ1-3GalNAc-2AA <sup>#MS1</sup> (Sialyl T antigen)	795(+)
Galβ1-3(Gal-(Fuc-)GlcNAcβ1-6)GalNAc-2AA + NeuAc <sub>1</sub> + SO <sub>3</sub>	1385(-)	Galβ1-3(GlcNAcβ1-6)GalNAc-2AA + NeuAc <sub>1</sub> <sup>#MS2</sup>	997(-)
Galβ1-3(Gal-GlcNAc-Gal-(Fuc-)(SO <sub>3</sub> -)GlcNAcβ1-6)GalNAc-2AA <sup>#SU2</sup>	1459(-)	Galβ1-3(Gal-GlcNAcβ1-6)GalNAc-2AA + NeuAc <sub>1</sub> <sup>#MS3</sup>	1159(-)
		Galβ1-3(Gal-(Fuc-)GlcNAcβ1-6)GalNAc-2AA + NeuAc <sub>1</sub> <sup>#MS4</sup>	1305(-)
Galβ1-3(Gal-GlcNAc-Gal-GlcNAcβ1-6)GalNAc-2AA + NeuAc <sub>1</sub> <sup>#MS5</sup>	1524(-)		
Galβ1-3(Gal-(Fuc-)GlcNAc-Gal-(Fuc-)(SO <sub>3</sub> -)GlcNAcβ1-6)GalNAc-2AA <sup>#SU3</sup>	1604(-)		
Galβ1-3(Gal-GlcNAc-Gal-(Fuc-)GlcNAcβ1-6)GalNAc-2AA + NeuAc <sub>1</sub> <sup>#MS6</sup>	1670(-)		
Galβ1-3(Gal-(Fuc-)GlcNAc-Gal-(Fuc-)GlcNAcβ1-6)GalNAc-2AA + NeuAc <sub>1</sub> <sup>#MS7</sup>	1816(-)		
Galβ1-3(Gal-(Fuc-)GlcNAc-Gal-(Fuc-)GlcNAcβ1-6)GalNAc-2AA + NeuAc <sub>1</sub> + SO <sub>3</sub>	1896(-)		
Galβ1-3((Gal-GlcNAc) <sub>2</sub> -Gal-GlcNAcβ1-6)GalNAc-2AA + NeuAc <sub>1</sub> + SO <sub>3</sub>	1969(-)		

Galβ1-3((Gal-GlcNAc) <sub>2</sub> -Gal-(Fuc-)GlcNAcβ1-6)-GalNAc-2AA + NeuAc <sup>#MS9</sup>	2035(-)
Galβ1-3(Gal-GlcNAc-Gal-(Fuc-)GlcNAc-Gal-(Fuc-)GlcNAcβ1-6)GalNAc-2AA + NeuAc	2181(-)
<u>Disialo fraction (Peak L-3, L-4, L-5): 37.1%</u>	
NeuAcα2-3Galβ1-3(NeuAcα2-6)GalNAc-2AA <sup>#BS1</sup>	1085(-)
NeuAc-Galβ1-3(NeuAc-Gal-GlcNAcβ1-6)GalNAc-2AA <sup>#DS2</sup>	1450(-)
NeuAc-Galβ1-3(NeuAc-Gal-(Fuc-)GlcNAcβ1-6)GalNAc-2AA	1596(-)
NeuAc-Galβ1-3(NeuAc-Gal-GlcNAc-Gal-GlcNAcβ1-6)GalNAc-2AA <sup>#DS3</sup>	1815(-)
NeuAc-Galβ1-3(NeuAc-Gal-GlcNAc-Gal-(SO <sub>3</sub> )GlcNAcβ1-6)GalNAc-2AA <sup>#SU4</sup>	1895(-)
NeuAc-Galβ1-3(NeuAc-Gal-GlcNAc-Gal-(Fuc-)GlcNAcβ1-6)GalNAc-2AA <sup>#DS4</sup>	1961(-)
NeuAc-Galβ1-3(NeuAc-Gal-(Fuc-)GlcNAc-Gal-(Fuc-)GlcNAcβ1-6)GalNAc-2AA <sup>#DS5</sup>	2107(-)
Galβ1-3((Gal-GlcNAc) <sub>2</sub> -Gal-(Fuc-)GlcNAcβ1-6)GalNAc-2AA + NeuAc <sup>#SU5</sup>	2115(-)
NeuAc-Galβ1-3(NeuAc-(Gal-GlcNAc) <sub>2</sub> -Gal-GlcNAcβ1-6)GalNAc-2AA <sup>#DS6</sup>	2180(-)
Galβ1-3(Gal-GlcNAc-Gal-(Fuc-)GlcNAc-Gal-(Fuc-)GlcNAcβ1-6)GalNAc-2AA + NeuAc <sup>#SU6</sup>	2260(-)
NeuAc-Galβ1-3(NeuAc-(Gal-GlcNAc) <sub>2</sub> -Gal-(Fuc-)GlcNAcβ1-6)GalNAc-2AA <sup>#DS7</sup>	2326(-)
NeuAc-Galβ1-3(NeuAc-Gal-GlcNAc-Gal-(Fuc-)GlcNAc-Gal-(Fuc-)GlcNAcβ1-6)GalNAc-2AA <sup>#DS8</sup>	2472(-)
NeuAc-Galβ1-3(NeuAc-(Gal-GlcNAc) <sub>3</sub> -Gal-(Fuc-)GlcNAcβ1-6)GalNAc-2AA	2691(-)

Degradation product

(Gal-GlcNAc)<sub>2</sub>-Gal-2AA<sup>#DP2</sup>

1029

269

Disialo fraction (Peak H-3, H-4): 62.4%

NeuAcα2-3Galβ1-3(NeuAcα2-6)GalNAc-2AA <sup>#BS1</sup>	1085(-)
(Disialyl T antigen)	
Galβ1-3(Gal-GlcNAcβ1-6)GalNAc-2AA + SO <sub>3</sub> + NeuAc <sup>#SU1</sup>	1238(-)
NeuAc-Galβ1-3(NeuAc-Gal-GlcNAcβ1-6)GalNAc-2AA <sup>#BS</sup>	1450(-)

2

Galβ1-3(Gal-GlcNAc-Gal-GlcNAcβ1-6)GalNAc-2AA + SO <sub>3</sub> + NeuAc	1604
NeuAc-Galβ1-3(NeuAc-Gal-GlcNAc-Gal-GlcNAcβ1-6)GalNAc-2AA <sup>#DS3</sup>	1815(-)
NeuAc-Galβ1-3(NeuAc-(Gal-GlcNAc) <sub>2</sub> -Gal-GlcNAcβ1-6)GalNAc-2AA <sup>#DS6</sup>	2180(-)

Degradation product

uAc-Gal-GlcNAc-Gal-2AA<sup>#DP1</sup>

956(+)



Gal-GlcNAc-Gal-(Fuc)GlcNAc-Gal-2AA#DF3	1176(-)
(Gal-GlcNAc) <sub>3</sub> -Gal-2AA +Fuc	1541(-)
NeuAc-Gal-(Fuc)GlcNAc-Gal-(Fuc)(SO <sub>3</sub> )GlcNAc-Gal-2AA#DF6	1691(-)
NeuAc-(Gal-GlcNAc) <sub>2</sub> -Gal-2AA +Fuc <sub>3</sub>	1758(-)

We showed ms/ms data for the glycan with # marks in supporting information. The information is available free of charge via the Internet at <http://pubs.acs.org>. The structures in blue are confirmed according to the analogous consideration on the structures of higher / lower series of *O*-glycans. The structures in red are not assigned in the present study, because we could not observe good MS<sup>n</sup> data.

Table 4. O-Glycans found in gastric cancer cell lines

O-glycans observed in MKN45	Molecular ions	O-glycans observed in MKN7	Molecular ions
<u>Asialo fraction (Peak M-1): 5.0%</u>			
Galβ1-3GalNAc-2AA	504 (+)		
GlcNAc-GalNAc-2AA	545 (+)		
Galβ1-3(GlcNAcβ1-6)GalNAc-2AA#A1	707 (+)		
<u>Monosialo fraction (Peak M-2, M-3): 21.3%</u>			
NeuAcα2-6GalNAc-2AA + Na (Sialyl Tn antigen)	654(+)	NeuAcα2-6GalNAc-2AA + Na (Sialyl Tn antigen)	654(+)
NeuAcα2-3Galβ1-3GalNAc-2AA#MS1 (Sialyl T antigen)	795(+)	NeuAcα2-3Galβ1-3GalNAc-2AA#MS1 (Sialyl T antigen)	795(+)
Galβ1-3(GlcNAcβ1-6)GalNAc-2AA + NeuAc1#MS2	998(+)	Galβ1-3(Gal-GlcNAcβ1-6)GalNAc-2AA + NeuAc1#MS3	1159(-)
Galβ1-3(Gal-GlcNAcβ1-6)GalNAc-2AA + NeuAc1#MS3	1159(-)	Galβ1-3(Gal-(Fuc-)GlcNAcβ1-6)GalNAc-2AA#MS4	1305
Galβ1-3(Gal-GlcNAc-Gal-GlcNAcβ1-6)GalNAc-2AA + NeuAc1#MS5	1524(-)		
Galβ1-3((Gal-GlcNAc)2-Gal-GlcNAcβ1-6)GalNAc-2AA + NeuAc1#MS8	1889(-)		
Galβ1-3((Gal-GlcNAc)3-Gal-GlcNAcβ1-6)GalNAc-2AA + NeuAc1#MS10	2254(-)		
Galβ1-3((Gal-GlcNAc)4-Gal-GlcNAcβ1-6)GalNAc-2AA + NeuAc1#MS12	2619(-)		
Galβ1-3((Gal-GlcNAc)5-Gal-GlcNAcβ1-6)GalNAc-2AA + NeuAc1#MS14	2984(-)		
<u>Disialo fractions (Peak M-4, M-6): 61.4%</u>			
NeuAcα2-3Galβ1-3(NeuAcα2-6)GalNAc-2AA#DS1 (Disialyl T antigen)	1085(-)	NeuAcα2-3Galβ1-3(NeuAcα2-6)GalNAc-2AA#DS1 (Disialyl T antigen)	1085(-)
NeuAc-Galβ1-3(NeuAc-Gal-GlcNAcβ1-6)GalNAc-2AA#DS2	1450(-)		
NeuAc-Galβ1-3(NeuAc-Gal-GlcNAc-Gal-GlcNAcβ1-6)GalNAc-2AA #DS3	1815(-)		
NeuAc-Galβ1-3(NeuAc-(Gal-GlcNAc)2-Gal-GlcNAcβ1-6)GalNAc-2AA #DS6	2180(-)		
NeuAc-Galβ1-3(NeuAc-(Gal-GlcNAc)3-Gal-GlcNAcβ1-6)GalNAc-2AA #DS9	2545(-)		
NeuAc-Galβ1-3(NeuAc-(Gal-GlcNAc)4-Gal-GlcNAcβ1-6)GalNAc-2AA #DS10	2910(-)		



Ac-2AA #DS10			
NeuAc-Gal $\beta$ 1-3(NeuAc-(Gal-GlcNAc) <sub>5</sub> -Gal-GlcNAc $\beta$ 1-6)GalN			3275(-)
Ac-2AA #DS11			
<u>Trisialo fraction (Peak M-5): 12.3%</u>			
NeuAc-Gal-GlcNAc (NeuAc-Gal-GlcNAc)Galb1-3(NeuAca2-			2106(-)
6)GalNAc-2AA #TS1			
NeuAc-Gal-GlcNAc (NeuAc-Gal-GlcNAc)Galb1-3(NeuAca2-			2471(-)
6)GalNAc-2AA + Gal-GlcNAc #TS2			
NeuAc-Gal-GlcNAc (NeuAc-Gal-GlcNAc)Galb1-3(NeuAca2-			2836(-)
6)GalNAc-2AA + (Gal-GlcNAc) <sub>2</sub> #TS3			
NeuAc-Gal-GlcNAc (NeuAc-Gal-GlcNAc)Galb1-3(NeuAca2-			3201(-)
6)GalNAc-2AA + (Gal-GlcNAc) <sub>3</sub> #TS4			
NeuAc-Gal-GlcNAc (NeuAc-Gal-GlcNAc)Galb1-3(NeuAca2-			3566(-)
6)GalNAc-2AA + (Gal-GlcNAc) <sub>4</sub> #TS5			
NeuAc-Gal-GlcNAc (NeuAc-Gal-GlcNAc)Galb1-3(NeuAca2-			3931(-)
6)GalNAc-2AA + (Gal-GlcNAc) <sub>5</sub> #TS6			

Degradation product

NeuAca2-3Gal-2AA	592(+)	
NeuAc-Gal-GlcNAc-Gal-2AA #DP1	957(+)	
NeuAc-(Gal-GlcNAc) <sub>2</sub> -Gal-2AA #DP4	1321(-)	
NeuAc-(Gal-GlcNAc) <sub>3</sub> -Gal-2AA #DP5	1686(-)	
NeuAc-(Gal-GlcNAc) <sub>4</sub> -Gal-2AA #DP7	2051(-)	
NeuAc-(Gal-GlcNAc) <sub>5</sub> -Gal-2AA	2416(-)	
NeuAc-(Gal-GlcNAc) <sub>6</sub> -Gal-2AA #DP8	2781(-)	
<u>Degradation product</u>		
NeuAca2-3Gal-2AA		592(+)
NeuAc-Gal-GlcNAc-Gal-2AA #DP1		956(+)

We showed ms/ms data for the glycan with # marks in supporting information. The information is available free of charge via the Internet at <http://pubs.acs.org>. The structures in blue are confirmed according to the analogous consideration on the structures of higher / lower series of O-glycans. The structures in red are not assigned in the present study, because we could not observe good MS<sup>n</sup> data.

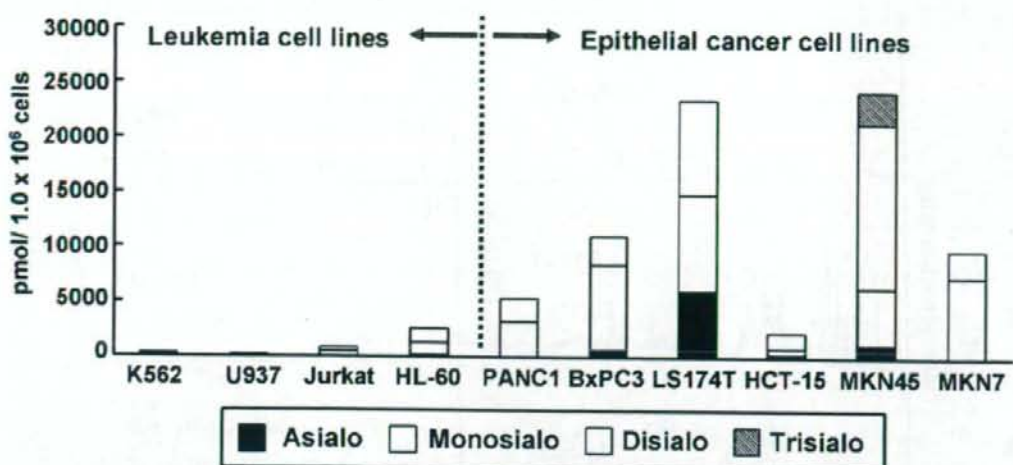


Fig.1 Comparison of the amounts of O-glycans expressed on cancer cells

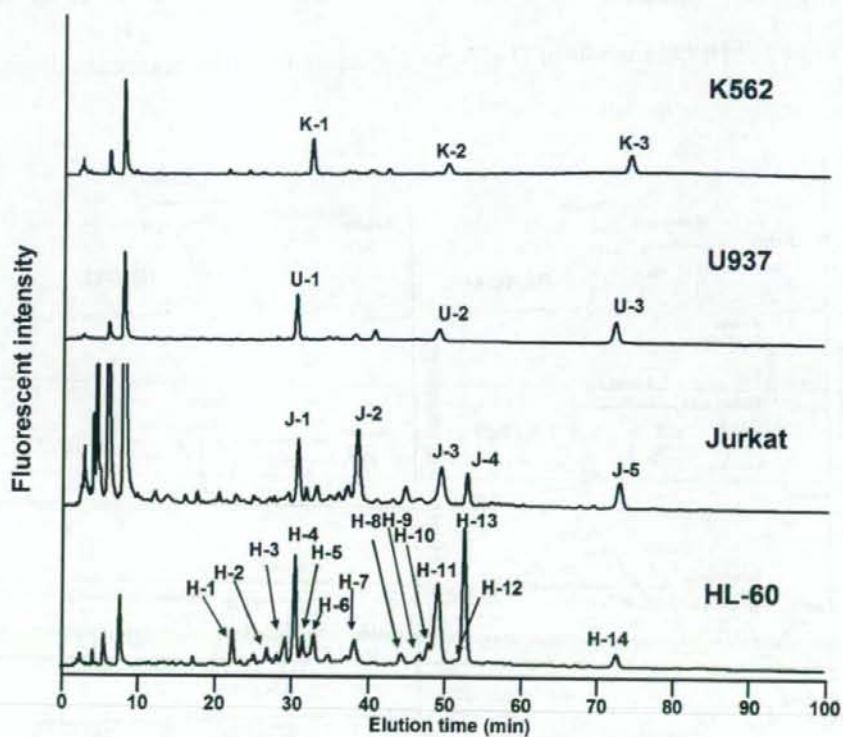


Fig.2 NP-HPLC analysis of O-glycans derived from leukemia cells



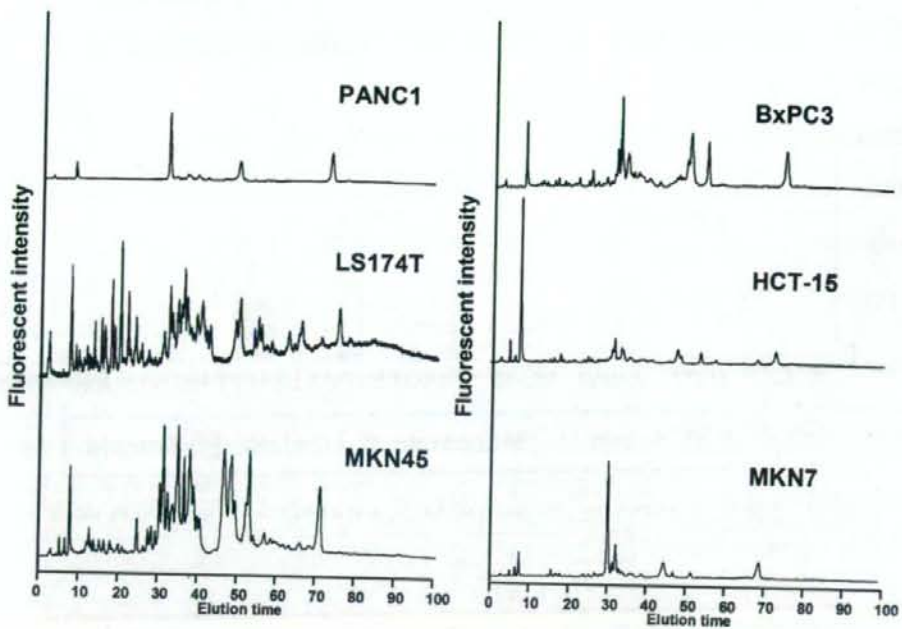


Fig.3 NP-HPLC analysis of O-glycans derived from epithelial cancer cells

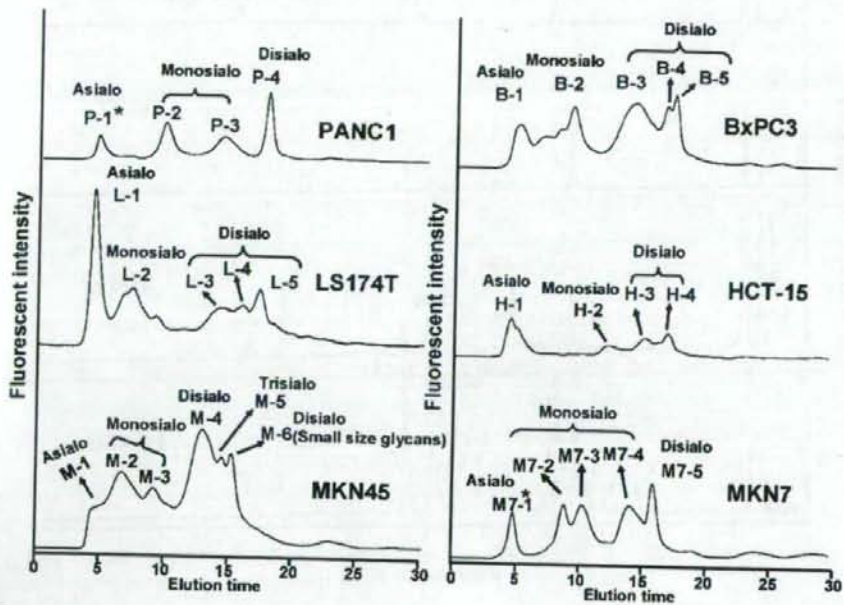


Fig.4 Separation of O-glycan pool derived from epithelial cancer cells by serotonin affinity chromatography

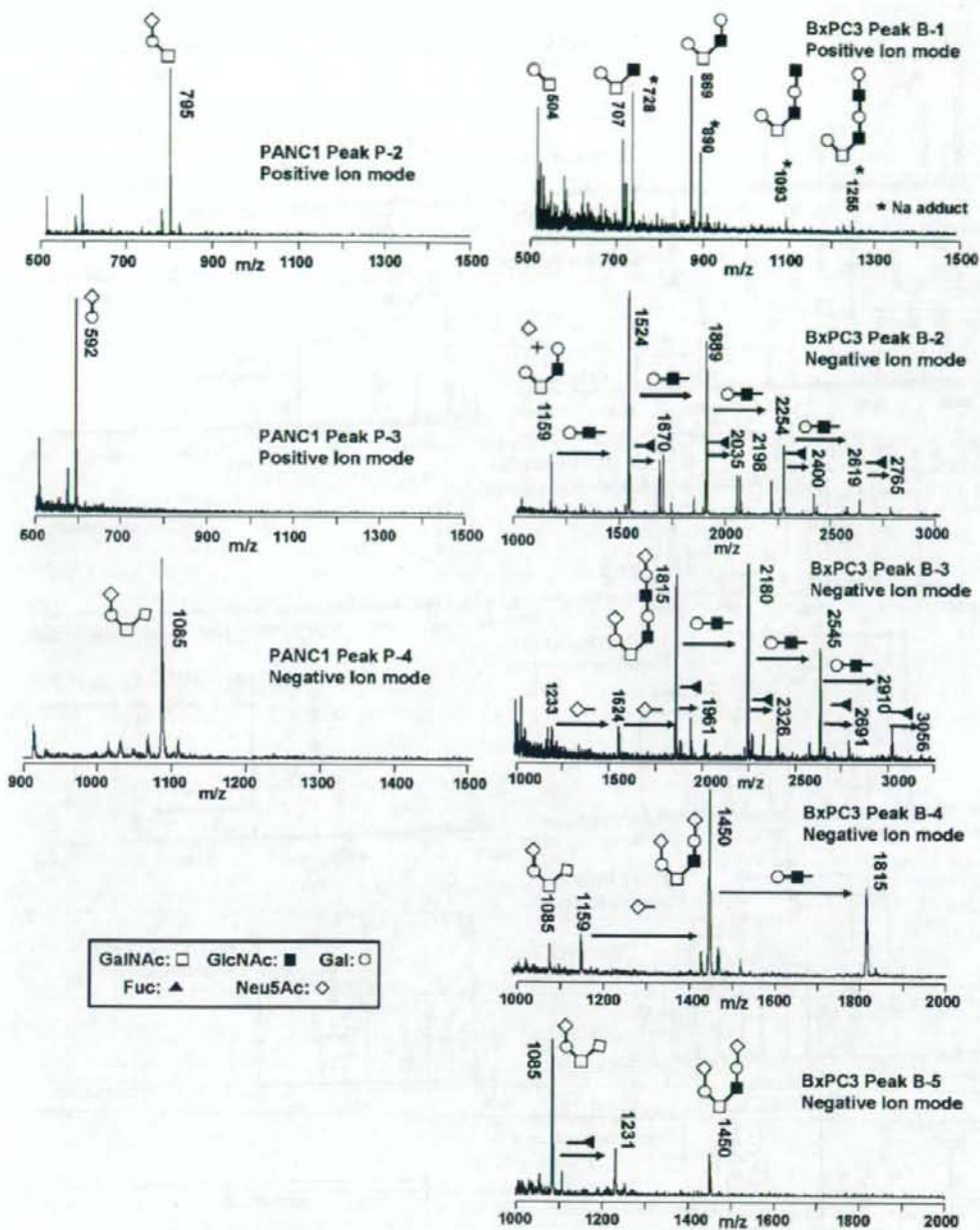


Fig.5 MALDI-TOF MS analysis of O-glycan fractions derived from PANC1 and BxPC3 cells

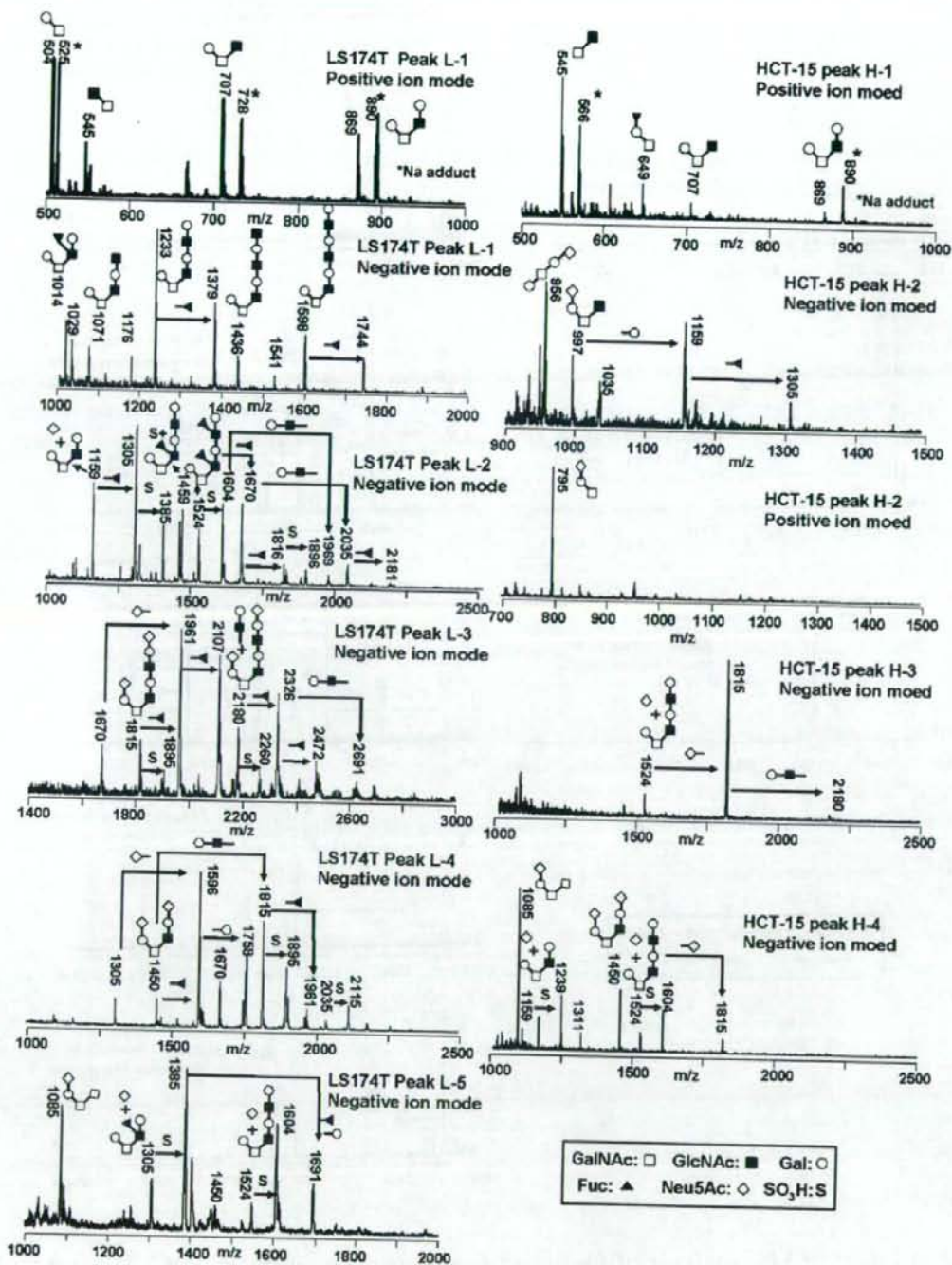


Fig.6 MALDI-TOF MS analysis of O-glycan fractions derived from LS174T and HCT-15 cells



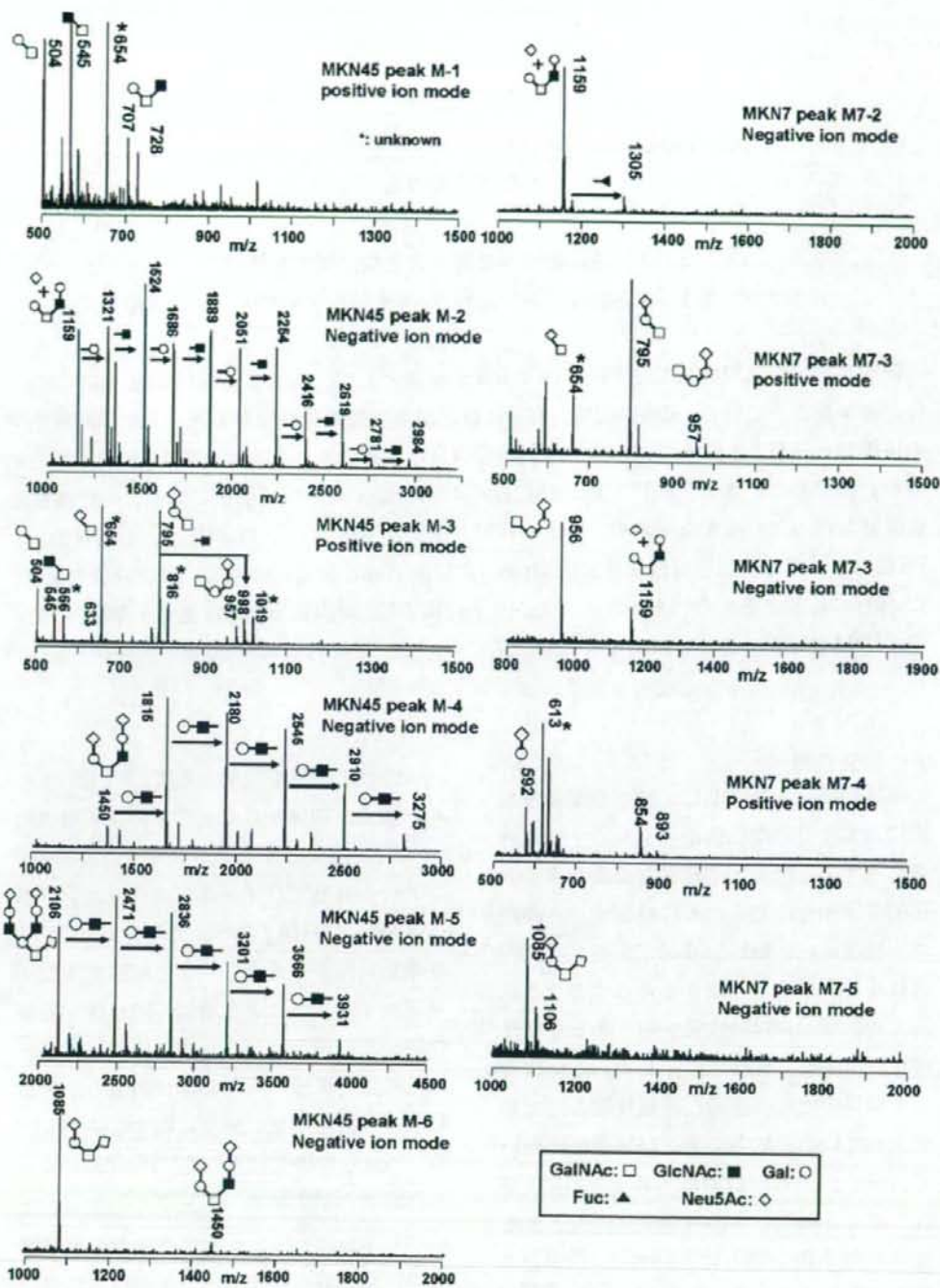


Fig.7 MALDI-TOF MS analysis of O-glycan fractions derived from MKN45 and MKN7 cells