

する上でも細胞の糖鎖は有効な指標となりうると考えられる。そこで、糖鎖を指標とした細胞評価技術について、分化誘導評価技術としての実行可能性について検証した。モデルとして、神経細胞へと分化するマウス胚性腫瘍細胞 P19 を用い、分化に伴う糖鎖の変化を追跡した。

マウス胚性腫瘍細胞 P19 を、レチノイン酸を含む培養液中で培養後、形成した細胞凝集塊を回収し、細胞を再分散させ、ポリ-L-リジンコートした細胞培養用ディッシュに播種した後、レチノイン酸を含まない培養液の中で 9 日間培養し神経細胞へと分化誘導させた。分化誘導開始後 0 日目（初日）、3 日目、6 日目、9 日目の細胞について糖鎖解析を行った。分化誘導開始から 0、3、6、9 日目の細胞由来 N-結合型糖鎖をシアリダーゼ処理した後、MALDI-TOF MS にて解析し、MS スペクトルから発現する糖鎖の相対比を算出した (Fig. 7)。分化開始 3、6 日目の細胞では複合型糖鎖の発現量は相対的に低く、ハイマンノース型糖鎖（が主要な糖鎖であった。また、2 本鎖糖鎖構造を骨格に持つ糖鎖のみを比較すると、分化 0 日目ではフコースが付加していない 2 本鎖糖鎖が全体の 24.0%であったのに対し、分化 9 日目では 28.2%と増加しており、逆に 2 本鎖糖鎖にフコースが 1 残基付加した糖鎖やフコースが 2 残基付加した糖鎖は分化 0 日目ですべて 13.6%、4.4%であったのが分化 9 日目では 6.8%、4.4%と減少していることがわかった。

以上のように、マウス胚性腫瘍細胞 P19 はレチノイン酸による分化誘導により複合型糖鎖の相対比が著しく減少し、また未分化な細胞ほどフコシル化糖鎖の割合が多く、神経細胞への分化に伴いフコシル化の程度が減少することがわかった。細胞のフコシ

ル化は細胞間の接着やシグナル伝達に関与し、胚の発育に重要な役割を果たすことが報告されており、また細胞のフコシル化は細胞の増殖能や分化能とも密接に関与することから、糖鎖を指標とする細胞の評価は細胞の分化誘導の評価法としても実行可能性を有すると言える。

#### C.4. iPS 細胞の糖タンパク質糖鎖解析 (平成 22 年度～平成 23 年度)

各種幹細胞を再生医療に応用するためには安全性の面で解決すべき問題点が残されている。例えば、培養の際に使用するフィーダー細胞の混入や血清などの異種動物に由来する成分による細胞の特性変化が考えられる。Furie らは iPS 細胞が異種動物由来シアル酸である N-グリコシルノイラミン酸 (NeuGc) を取り込んだ結果、細胞表面に提示されることを報告している。このように各種幹細胞の培養工程では、細胞外の糖タンパク質等の混入は不可避的であり、細胞の品質管理では、細胞の均一性だけでなく、製造工程に由来する不純物の有無の確認も重要な項目である。

本項ではヒト iPS 細胞である Tic、Dotcom、201B7、Toe、UTA-1、Squeaky の 6 種類について、N-結合型糖鎖を解析した。

##### C.4.1 iPS 細胞の N-結合型糖鎖分析

今後も数多く樹立されることが予想される iPS 細胞株については、起源となる細胞種の違いや、同一細胞であっても細胞自体の特性が異なることが想定され、iPS 細胞としての標準化が必要になると考えられる。文部科学省も「iPS 細胞研究ロードマップ」において iPS 細胞の実用化へ向けて、早急に対応すべき重要な課題としてその標準化を挙げており、細胞の培養法、分化方法だ

けでなく、保存や管理方法とそれら进行评估する方法と基準を早急に整備する必要がある。

細胞の複合糖質糖鎖は遺伝子やタンパク質などと同様に細胞の性質変化等に応答しその発現パターンが変化するため、細胞標準化のための指標としても有用であると考えられる。そこで、6種類のiPS細胞のN-結合型糖鎖について解析を行い、iPS細胞に共通に発現が認められる糖鎖と細胞固有の糖鎖発現の有無について調査した。6種類のiPS細胞のN-結合型糖鎖をシアル酸残基数に基づきセロトニンアフィニティークロマトグラフィーで分画した後、シアリダーゼ処理しシアロ糖鎖としたものをMALDI-TOF MSにて分析し、細胞間で比較した結果をFig. 8に示す。

6種類のiPSはいずれもアシアロ/ハイマンノース型糖鎖分画を43.6~58.2%含み、マンノース5、6、7、8、9残基からなるハイマンノース型糖鎖が主要な糖鎖であった。モノシアロ糖鎖分画については27.2~30.6%含み、すべての細胞で2本鎖糖鎖にフコースが1残基修飾した糖鎖が最も含量の高い成分として観察され、この糖鎖にさらにフコースが1残基付加した糖鎖も観察された。ジシアロ分画は10.5~15.5%含み、複合型2本鎖糖鎖とフコースが1残基付加した糖鎖が主要ピークとして観察された。同様にトリシアロ分画については3.6~9.7%含み、Tic以外の5種類の細胞では複合型2本鎖糖鎖が主要ピークとして観察され、Ticでは複合型2本鎖糖鎖にフコースが1残基付加した糖鎖や、この糖鎖に硫酸基が付加した糖鎖が観察された。テトラシアロ分画については0.3~2.2%含み、Ticについては0.3%と含量が低かった。

以上、6種類の細胞から73種類のN-結合型糖鎖を確認できた。観察された糖鎖はハイマンノース型糖鎖、複合型2本鎖、複合型3本鎖糖鎖および複合型糖鎖にフコースが1あるいは2残基付加した糖鎖が主要な糖鎖であった。また、トリシアロ分画において6種類の細胞では複合型2本鎖糖鎖にシアル酸が3残基あるいは4残基付加した糖鎖も確認された。複合型2本鎖糖鎖にシアル酸が3残基あるいは4残基付加した糖鎖は、ヒトでは通常観察されない糖鎖であるため、培養過程から混入した糖タンパク質由来であると考えられた。次に、6種類の細胞で観察される糖鎖のうち、MALDI-TOF MSの結果を元にモノシアロ分画、ジシアロ分画に観察される糖鎖についてフコースの修飾率を比較した(Fig. 9)。

モノシアロ分画ではいずれの細胞でもフコースによる修飾率は高く、特にフコースを1残基持つ糖鎖は全ての細胞で50%以上であった。また、フコースを2残基持つジフコシル糖鎖も14%以上を占め、iPS細胞は種類にかかわらず、フコースによる修飾率が高いことがわかった。ジシアロ分画では、モノフコシル化糖鎖がTic細胞で72%、Dotcom細胞で50%と高い値を示したものの、他の4細胞では35%以下とモノシアロ分画の場合と比べて低い値であった。以上の結果、iPS細胞は複合型糖鎖にフコースが1あるいは2残基付加したフコシル化糖鎖を発現することが共通の特徴であった。

#### C.4.2. iPS細胞のシアル酸分析

iPS細胞のN-結合型糖鎖解析の結果、複合型2本鎖糖鎖にシアル酸が3残基あるいは4残基付加したと考えられる異種動物由来糖鎖が観察された。この事実からも、iPS細胞は培養過程から異種動物由来の糖鎖が

混入しうると考えられた。本項では、ヒトに存在せずヒト以外の動物種に広く発現している N-グリコシルノイラミン酸 (NeuGc) を指標とし、異種動物由来成分の混入について調査した。6 種類の iPS 細胞中の糖鎖を塩酸加水分解しシアル酸を遊離させた後、1,2-diamino-4,5-methylenedioxybenzene

(DMB) で誘導体化し逆相 HPLC を用いてシアル酸の分子種の解析を行った。結果を Fig. 10 に示す。結果、全細胞のいずれにおいても NeuGc が観察された。また、各細胞における NeuAc と NeuGc の相対比を比較すると、Tic、Dotcom、201B7、Toe、UTA-1、Squeaky で総シアル酸含量の 3.4 %、13.9 %、14.8 %、17.9 %、23.7 %、25.1 % が NeuGc であった。ヒトでは NeuGc を合成する NeuAc 水酸化酵素は不活化されており、ヒトでの発現は認められない。そのため、6 種類の iPS 細胞で確認された NeuGc は培養過程で使用される異種動物由来成分に由来すると考えられた。

#### C.5 iPS 細胞に混入する異種動物由来糖鎖の解析 (平成 23 年度)

iPS 細胞をはじめとする各種幹細胞を再生医療実用化に応用するためには安全性の面で解決すべき問題点が残されている。

る。iPS 細胞は、最終製品に至るまでの工程において、マウス胎児組織由来のフィーダー細胞 (MEF)、動物血清あるいは血清代替物 (KSR)、塩基性線維芽細胞増殖因子

(FGF-2) 等の異種動物由来成分を添加した培養液を用いて培養される。そのため、異種動物由来成分の混入は不可避的であるが、それらが免疫原性を示す可能性があることを考えた場合、混入しうると異種動物由来成分を明らかにし、それらの混入を防ぐ方策を講じなければならない。実際、前年度の

研究から、iPS 細胞には N-グリコシルノイラミン酸 (NeuGc) のような異種動物由来と考えられる糖鎖が観察されたが、本研究開始時点ではその詳細ならびに混入原因は不明であった。

以上の背景の下、本項では培養過程で異種動物由来成分を含む材料を用いて培養されたヒト iPS 細胞 (Toe、UTA-1) の N-結合型糖鎖の網羅的解析を行い、異種動物由来糖鎖混入の有無、ならびに混入原因について調査した。

#### C.5.1 iPS 細胞に混入する異種動物由来 N-結合型糖鎖の解析

異種動物由来成分を含む材料を用いて培養された Toe と UTA-1 の 2 種類の iPS 細胞の N-結合型糖鎖について蛍光標識化後、シアル酸残基数に基づきセロトニンアフィニティークロマトグラフィーで分画後、シアリダーゼ処理後、アジアロ糖鎖としたものを、順相分配モードの HPLC と MALDI-TOFMS を組合わせて分析した。結果を Fig. 11 と Table 4 に示す。アジアロ/ハイマンノース型糖鎖分画ではハイマンノース型糖鎖の他、フコースによる修飾を受けた複合型 2 本鎖糖鎖が共通して観察された。モノシアロ分画ではフコースが 0~2 残基付加した複合型 2 本鎖糖鎖が共通して観察された他、フコースを 1 残基持つ複合型 3 本鎖糖鎖が両細胞に観察された。ジシアロ分画では Toe 細胞でフコースを持たない複合型 2 本鎖糖鎖とフコースを 1 残基持つ複合型 2 本鎖糖鎖が主要な糖鎖として観察された。一方、UTA-1 細胞では、複合型 2 本鎖糖鎖にさらにヘキソースが 1 あるいは 2 残基付加した糖鎖が観察された。これらの糖鎖は MSMS 解析の結果、複合型 2 本鎖糖鎖の非還元末端 Gal にさらに  $\alpha$  1-3 結合した

Galを有する $\alpha$ Galエピトープを持つ糖鎖であった。

トリシアロ分画ではいずれの細胞からも複合型2本鎖糖鎖と複合型3本鎖糖鎖が観察された。一般にヒト細胞では複合型2本鎖糖鎖にシアル酸が3残基付加した糖鎖は生合成されないため観察されない。一方、マウスやラットなどのげっ歯では複合型2本鎖糖鎖にシアル酸が3残基付加した糖鎖を生合成しうることから、トリシアロ2本鎖糖鎖は異種動物由来成分に由来すると考えられた。また、セロトニンアフィニティークロマトグラフィーで分画された各シアロ糖鎖分画についてシアル酸分析した結果、いずれの分画からも、N-グリコリルノイラミン酸 (NeuGc) が検出された。

以上、異種動物由来成分を含む材料を用いて培養されたヒトiPS細胞(Toe、UTA-1)のN-結合型糖鎖の網羅的解析の結果、 $\alpha$ GalエピトープやN-グリコリルノイラミン酸 (NeuGc) を持つ糖鎖などのヒトでは生合成されない糖鎖が観察された。このことから、異種動物由来成分を含む材料を用いてiPS細胞を培養した場合、異種動物由来糖鎖が混入しうることがわかった。

#### C.5.2 iPS細胞培養過程で用いる異種動物由来成分のN-結合型糖鎖解析

iPS細胞をはじめとする各種幹細胞をの培養の際に使用するフィーダー細胞の混入や血清代替物などの異種動物に由来する成分の混入については、培養方法の完全ヒト化への移行に伴い、マスターセルバンク、ワーキングセルバンクの構築においては回避されつつある。しかしながら、細胞樹立時や未分化能維持の目的で異種動物由来成分を使用する場合においては、最終製品においても異種動物由来成分混入の有無を確

認することと、混入しうる異種動物由来成分とその原因を明らかにしておくことが必要である。iPS細胞等の各種幹細胞の培養では、フィーダーレイヤーとして、マウス胎児繊維芽細胞 (MEF) や細胞外マトリックス構成成分であるマトリジェル、フィブロネクチン、培養液には血清代替物 (KSR) の他、各種細胞増殖因子等を添加した培養液を用いて培養される。すなわち、これら材料中に異種動物由来成分が含まれるか否かを調査し、幹細胞への異種動物由来糖鎖混入の原因としての可能性を明らかにしておくことは重要である。本項ではToeならびにUTA-1のN-結合型糖鎖中に観察された異種動物由来糖鎖の混入原因として、血清代替物 (KSR) とマウス胎児繊維芽細胞 (MEF) の着目し、前述したN-結合型糖鎖の網羅的解析法を用いて $\alpha$ GalエピトープやN-グリコリルノイラミン酸 (NeuGc) を持つ糖鎖の有無について調べた。

iPS細胞の解析と同様に、MEFとKSRからN-結合型糖鎖を調製し、2-アミノ安息香酸 (2-AA) により蛍光標識化後、シアル酸残基数に基づきセロトニンアフィニティークロマトグラフィーで分画した。その結果、KSRの各シアロ糖鎖分画には、N-アセチルノイラミン酸 (NeuAc) により修飾された糖鎖より  $m/z$  16 大きなイオンシグナルがMALDI-TOFMS分析にて観察されN-グリコリルノイラミン酸 (NeuGc) により修飾を受けた糖鎖が含まれることがわかった。

次に、全ての分画について、シアリダーゼ処理を行いアシアロ糖鎖としたものについて、順相分配モードのHPLCにより分離し、分離された各ピークを分取し、MALDI-TOFMSにて分析した。結果をFig. 12とTable5に示す。MEFのアシアロ/ハイマンノース型糖鎖分画ではマンノース残基

5~9 残基からなるハイマンノース型糖鎖が主要な糖鎖として観察された。KSR ではマンノース残基 5、6、8、9 残基からなるハイマンノース型糖鎖の他、コアフコースを持つ複合型 2 本鎖糖鎖も観察された。モノシアロ分画でいずれにも複合型 2 本鎖糖鎖とコアフコースを持つ複合型 2 本鎖糖鎖が共通して観察された他、MEF では複合型 3 本鎖と 4 本鎖糖鎖も観察された。一方、KSR には  $\alpha$  Gal エピトープを持つ糖鎖が観察された。

ジシアロ分画については、MEF では複合型 3 本鎖、KSR では MEF では複合型 2 本鎖が主要な糖鎖として観察された。一方、トリシアロ分画について、MEF では複合型 3 本鎖、KSR では MEF では複合型 2 本鎖が主要な糖鎖として観察された。テトラシアロ分画については、MEF では複合型 3 本鎖、KSR では複合型 2 本鎖が主要な糖鎖として観察された。

以上、KSR には  $\alpha$  Gal エピトープを持つ糖鎖、複合型 2 本鎖糖鎖にシアル酸が 3 あるいは 4 残基結合したと考えられる糖鎖などのヒトでは生合成されない糖鎖が観察された。このことから、KSR は Toe と UTA-1 の 2 種の iPS 細胞で観察された異種動物由来と考えられる糖鎖の混入原因となりうるということがわかった。

#### D. まとめ

本研究結果から、細胞の糖鎖プロファイルが各細胞の特性解析、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など、きわめて広範囲に応用できる可能性を持つことがわかった。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、細胞の品質を管理することが重要である。細胞の糖タンパク質糖鎖プロファイルを分析する技術は、この目的を達成しうる可能性を持ち、再生医療実用化研究を推進するために細胞の糖鎖が指標として有用であることは明らかである。一方、糖鎖を再生医療の実用化のために応用していくためには、様々な段階の細胞の発現糖鎖情報を蓄積しながら、糖鎖解析技術を共通のプラットフォームとして利用していくための細胞表面糖鎖の迅速、簡便、かつ特異的・定量的な方法論の確立が必要不可欠であり、今後レクチンアレイなどのハイスループットスクリーニング技術を活用も視野に入れた細胞評価技術の進展が望まれる。

#### E. 研究発表

##### 1. 論文発表

- 1) Kakoi N, Kinoshita M, Kawasaki N, Yamaguchi T, Hayakawa T, Kakehi K. Capillary electrophoresis analysis of contaminants in heparin sodium for the Japanese pharmacopoeia purity test. *Yakugaku Zasshi*. 2009, 129(10), 1255-1264.
- 2) Yamada K, Watanabe S, Kita S, Kinoshita M, Hayakawa T, Kakehi K. Determination of Tn antigen released from cultured cancer cells by capillary electrophoresis. *Anal Biochem*. 2010, 396(1), 161-163.
- 3) Kinoshita M, Ohta H, Higaki K, Kojima Y, Urashima T, Nakajima K, Suzuki M, Kovacs KM, Lydersen C, Hayakawa T, Kakehi K. Structural characterization of multibranched oligosaccharides from seal milk by a combination of off-line high-performance liquid chromatography-matrix-assisted laser desorption / ionization-time-of-flight mass spectrometry and sequential exoglycosidase digestion.

Anal Biochem. 2009, 388(2), 242-253.

4) Yamada K, Kinoshita M, Hayakawa T, Nakaya S, Takehi K. Comparative studies on the structural features of O-glycans between leukemia and epithelial cell lines. J. Proteome Res. 2009 8(2):52-37

5) Yamada K, Hyodo S, Kinoshita M, Hayakawa T, Takehi K. Hyphenated technique for releasing and MALDI MS analysis of O-glycans in mucin-type glycoprotein samples. Anal Chem. 2010 82(17):7436-7443.

5) Kinoshita M, Kakoi N, Matsuno YK, Hayakawa T, Takehi K. Determination of sulfate ester content in sulfated oligo- and poly-saccharides by capillary electrophoresis with indirect UV detection. Biomed Chromatogr. 2011 25(5):588

6) Yamada K, Mitsui Y, Kakoi N, Kinoshita M, Hayakawa T, Takehi K. One-pot characterization of cancer cells by the analysis of mucin-type glycans and glycosaminoglycans. Anal Biochem. 2011 in press

7) Oyama T, Yodohsi M, Yamane A, Takehi K, Hayakawa T, Suzuki S. Rapid and sensitive analyses of glycoprotein-derived oligosaccharides by liquid chromatography and laser-induced fluorometric detection capillary electrophoresis. J Chromatogr B 2011 879(27):2928-

8) Yamamoto S, Shinohara C, Fukushima E, Takehi K, Hayakawa T, Suzuki S. Partial-filling affinity capillary electrophoresis of glycoprotein oligosaccharides derivatized with 8-aminopyrene-1,3,6-trisulfonic acid. J Chromatogr A. 2011 1218(29):4772

9) Yodoshi M, Oyama T, Masaki K, Takehi K, Hayakawa T, Suzuki S. Affinity entrapment of oligosaccharides and glycopeptides using free lectin solution. Anal Sci. 2011 27(4):395.

## 2. 学会発表

1) ヒト組織球性リンパ腫細胞に発現する Poly lactosamine-Carrier Protein のグライコプロテオーム解析

田中佑樹、三ツ井洋輔、木下充弘、早川

堯夫、掛樋一晃

第 129 回日本薬学会年会

2) ヘパリンナトリウム純度試験へのキャピラリー電気泳動法の適用について

梶直孝、木下充弘、川崎ナナ、早川堯夫、掛樋一晃

第 129 回日本薬学会年会

3) アジアゾウミルク中の高分子中性オリゴ糖の構造解析

仲西暁良、木下充弘、浦島匡、早川堯夫、掛樋一晃

第 129 回日本薬学会年会

4) ヒト血清糖タンパク質糖鎖の疾患マーカーとしての可能性

山本晃裕、山田佳太、木下充弘、森嶋祥之、早川堯夫、掛樋一晃

第 129 回日本薬学会年会

5) 加齢マーカーとしての糖鎖の可能性  
能登啓介、奥田茜、木下充弘、早川堯夫、掛樋一晃

第 129 回日本薬学会年会

6) Tn 抗原の化学的分析法

山田佳太、渡辺沙木絵、木下充弘、中家修一、早川堯夫、掛樋一晃

第 129 回日本薬学会年会

7) 培養癌細胞中の O 結合型糖鎖の網羅解析

山田佳太、渡辺沙木絵、木下充弘、中家修一、早川堯夫、掛樋一晃

第 29 回日本糖質学会年会

8) エボラウイルス表面糖タンパク質中の N-及び O-結合型糖鎖解析

山田佳太、宇佐美克明、早川堯夫、掛樋一晃、入村達郎

第 29 回日本糖質学会年会

9) 加齢に伴うラット血清糖タンパク質糖鎖の変化-加齢マーカーとしての糖鎖の可能性-

能登啓介、奥田茜、木下充弘、早川堯夫、掛樋一晃

第 29 回日本糖質学会年会

10) ヒト組織球性リンパ腫細胞に発現する Poly lactosamine-Carrier Protein のグライコプロテオーム解析

田中佑樹、三ツ井洋輔、木下充弘、早川堯夫、掛樋一晃

第 59 回日本薬学会近畿支部大会  
11)加齢により変動する血清糖タンパク質糖鎖の解析と加齢マーカーとしての可能性の検証  
木下充弘、能登啓介、奥田茜、渡部沙木絵、早川堯夫、掛樋一晃  
第 59 回日本薬学会近畿支部大会  
12)キャピラリー電気泳動を用いたヒト組織球性リンパ腫細胞に発現する  
13)Polylactosamine-Carrier Protein のグライコプロテオーム解析  
田中佑樹、三ツ井洋輔、木下充弘、早川堯夫、掛樋一晃  
14)フコシル化を回復させた HCT116 細胞上に観察される糖タンパク質糖鎖  
第 82 回日本生化学会大会  
梶直孝、山田佳太、田中佑樹、岩本竜昇、木下充弘、三善英知、森脇健太、早川堯夫、掛樋一晃  
第 82 回日本生化学会大会  
15)加齢に伴うラット血清糖タンパク質糖鎖の変化  
能登啓介、奥田茜、渡部沙木絵、木下充弘、早川堯夫、掛樋一晃  
第 82 回日本生化学会大会  
16)グライコミクスによる癌細胞の個性解析とグライコプロテオミクスへの展開  
三ツ井洋輔、山田佳太、梶直孝、木下充弘、早川堯夫、掛樋一晃  
第 11 回関西グライコサイエンスフォーラム、平成 22 年 5 月 15 日、大阪市立大学(大阪)  
17)Targeted glycoproteomics of polylactosamine-carrier proteins expressed on human histocytic lymphoma cells  
Y. Mitsui, Y. Tanaka, K. Yamada, S. Hara, M. Kinoshita, T. Hayakawa, K. Kakehi  
The 25th International Carbohydrate Symposium、平成 22 年 8 月 4 日、幕張メッセ(千葉)  
18)A considerable amount of free glycans derived from glycoproteins are present in sera  
K. Yamada, K. Kamisue, S. Watanabe, M. Kinoshita, T. Hayakawa, K. Kakehi  
The 25th International Carbohydrate Symposium、平成 22 年 8 月 4 日、幕張メッセ(千葉)

セ(千葉)  
19) Analysis of Characteristics of Cells using Glycans as Marker Molecules  
A. Nakanishi, M. Sato, M. Kinoshita, K. Kakehi, T. Hayakawa  
The 25th International Carbohydrate Symposium、平成 22 年 8 月 4 日、幕張メッセ(千葉)  
20)キャピラリー電気泳動を用いる糖鎖を指標とする細胞評価法 - 再生医療実用化に向けた基礎検討 -  
仲西暁良、佐藤葵、木下充弘、森山博由、早川堯夫、掛樋一晃  
第 30 回 キャピラリー電気泳動シンポジウム平成 22 年 11 月 17 日、長良川国際会議場(岐阜)  
21)糖鎖を指標とする細胞の個性解析  
仲西暁良、佐藤葵、木下充弘、早川堯夫、掛樋一晃  
第 33 回日本分子生物学会年会・第 83 回日本生化学会大会合同大会、平成 22 年 12 月 9 日、神戸ポートアイランド(兵庫)  
22)グライコプロテオミクスによるポリラクトサミン型糖鎖キャリアータンパク質の解析  
三ツ井洋輔、山田佳太、梶直孝、田中佑樹、木下充弘、早川堯夫、掛樋一晃  
第 33 回日本分子生物学会年会・第 83 回日本生化学会大会合同大会、平成 22 年 12 月 9 日、神戸ポートアイランド(兵庫)  
23)癌特異的糖タンパク質のグライコプロテオーム解析  
三ツ井洋輔、山田佳太、田中佑樹、梶直孝、木下充弘、早川堯夫、掛樋一晃  
日本薬学会 第 131 年会、平成 23 年 3 月、ツインメッセ静岡(静岡)  
24)ヒト胃癌細胞中の高フコシル化糖タンパク質の探索  
三ツ井洋輔、原沙弥香、山田佳太、木下充弘、早川堯夫、掛樋一晃、  
日本薬学会 第 131 年会、平成 23 年 3 月、ツインメッセ静岡(静岡)  
25)エイジングマーカーとしての糖鎖の可能性  
木下充弘、能登啓介、奥田茜、小南有加、早川堯夫、掛樋一晃

第 30 回日本糖質学会年会、平成 23 年 7 月 11 日、長岡

26)細胞外遊離 N-グリコシルノイラミン酸のヒト培養癌細胞への取り込み

橋本浩志、仲西暁良、木下充弘、鈴木匡、早川堯夫、掛樋一晃

第 30 回日本糖質学会年会、平成 23 年 7 月 11 日、長岡

27)ヒト胃癌細胞中高フコシル化糖タンパク質のグライコプロテオーム解析

原沙弥香、山田佳太、三ツ井洋輔、木下充弘、早川堯夫、掛樋一晃

第 30 回日本糖質学会年会、平成 23 年 7 月 11 日、長岡

28)ヒト胃癌細胞 MKN45 細胞は糖タンパク質由来の遊離糖鎖を細胞外へ分泌する

神末和哉、大河原周平、山田佳太、岩塚欣也、木下充弘、早川堯夫、掛樋一晃

第 30 回日本糖質学会年会、平成 23 年 7 月 11 日、長岡

29)ヒト胃癌細胞中の高フコシル化糖タンパク質の探索

原沙弥香、山田佳太、三ツ井洋輔、木下充弘、早川堯夫、掛樋一晃

第 61 回日本薬学会近畿支部、平成 23 年 10 月 22 日、神戸

30)ヒト胃癌細胞 MKN45 による糖タンパク質由来遊離糖鎖の細胞外分泌

神末和哉、大河原周平、山田佳太、岩塚欣也、木下充弘、早川堯夫、掛樋一晃

第 61 回日本薬学会近畿支部、平成 23 年 10 月 22 日、神戸

31)マイクロチップ等電気泳動法によるタンパク質製剤の迅速解析技術の開発

中辻佑強、岸本昌太、木下充弘、早川堯夫、荒井昭博、中村伸、掛樋一晃

第 61 回日本薬学会近畿支部、平成 23 年 10 月 22 日、神戸

32)CESI-MS によるペプチド・タンパク質分析

神末和哉、木下充弘、掛樋一晃

第 31 回キャピラリー電気泳動シンポジウム、平成 23 年 11 月 11 日、鶴岡

## F. 知的財産権の出願・登録状況

### F-1. 特許取得

なし

### F-2. 実用新案登録

なし

### F-3. その他

特記事項なし

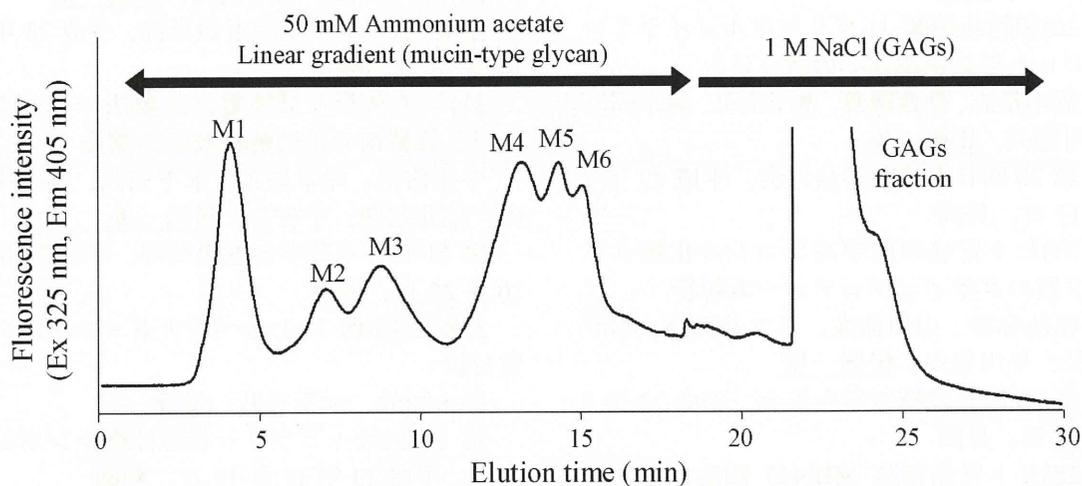


Fig.1 Serotonin affinity chromatography of O-linked glycans derived from HCT116 cell. Analytical conditions; column, LA-serotonin (4.6 x 150 mm). flow rate, 0.5 mL/min. eluent; solvent A, water. solvent B, 50 mM Ammonium acetate in water. gradient conditions, a linear gradient (5-40 % solvent B) from 2 to 20 min and 1 M NaCl from 20 to 45 min.

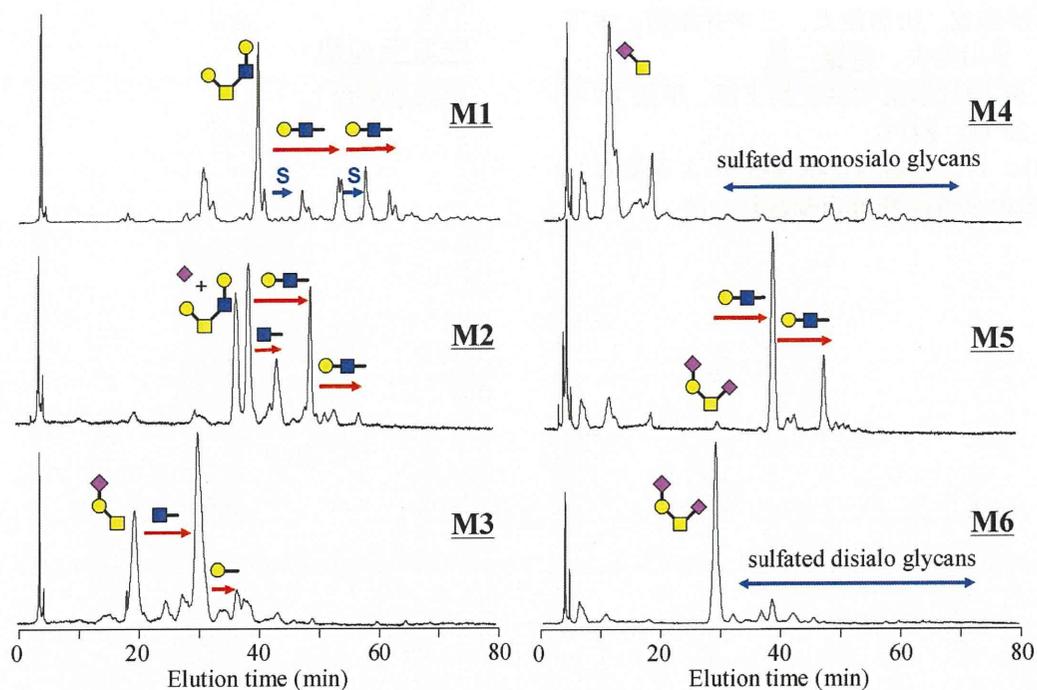


Fig.2 NP-HPLC analysis of mucin-type O-glycans from HCT116 cell. Analytical conditions: column, TSK-GEL Amide-80 (4.6 x 250 mm). flow rate, 0.8 mL/min. eluent, solvent A, 0.1% CH<sub>3</sub>COOH in MeCN. solvent B, 0.2% CH<sub>3</sub>COOH/0.2% triethylamine in water. gradient conditions: a linear gradient (15-50 % solvent B) from 5 to 85 min.

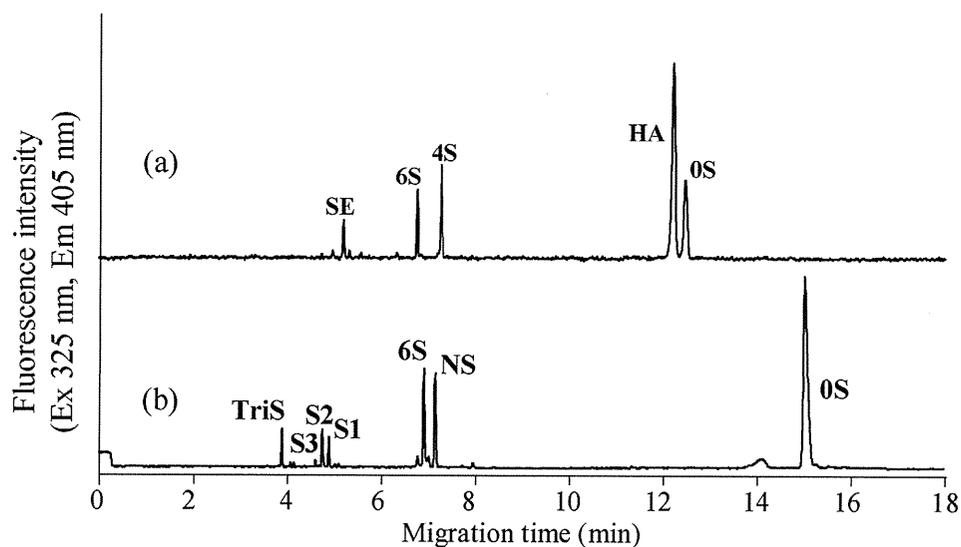
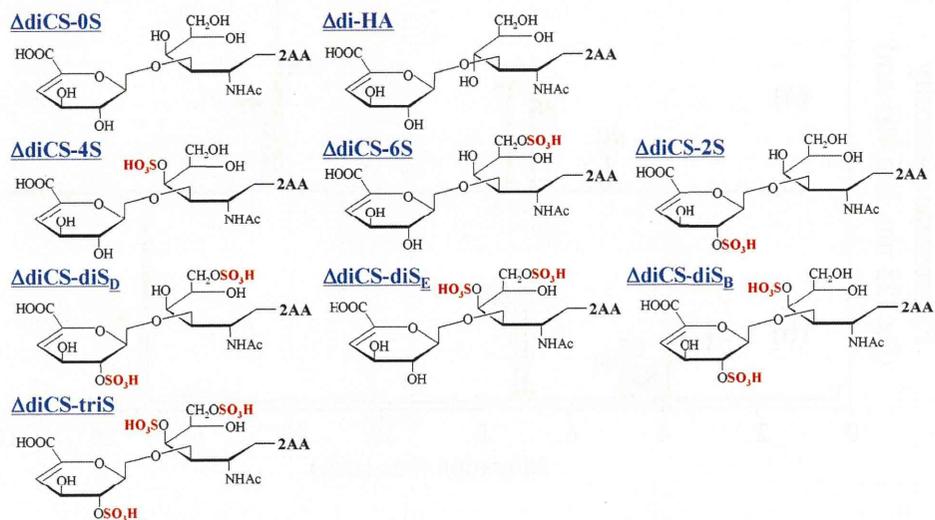


Fig.3 CE analysis of unsaturated disaccharides from HCT116 cell. Analytical conditions; Capillary, fused silica (40 cm x 50  $\mu$ m.i.d). Buffer, 100 mM Tris-phosphate buffer (pH 3.0). Applied voltage, 25 kV. Injection, pressure method (1.0 psi, 10 sec). Temperature, 25 °C. Detection, He-Cd laser induced fluorescent detection (Ex: 325 nm, Em: 405 nm).

### CS and HA unsaturated disaccharides



### HS unsaturated disaccharides

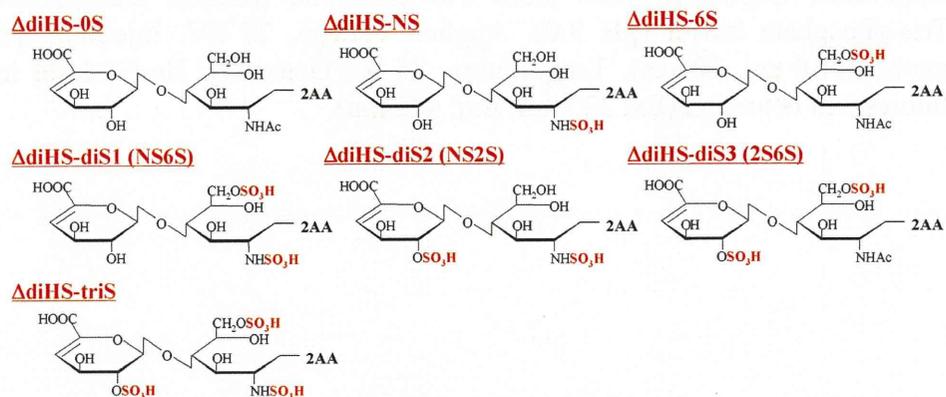


Fig.4 Structures of unsaturated disaccharides from CS and HS.

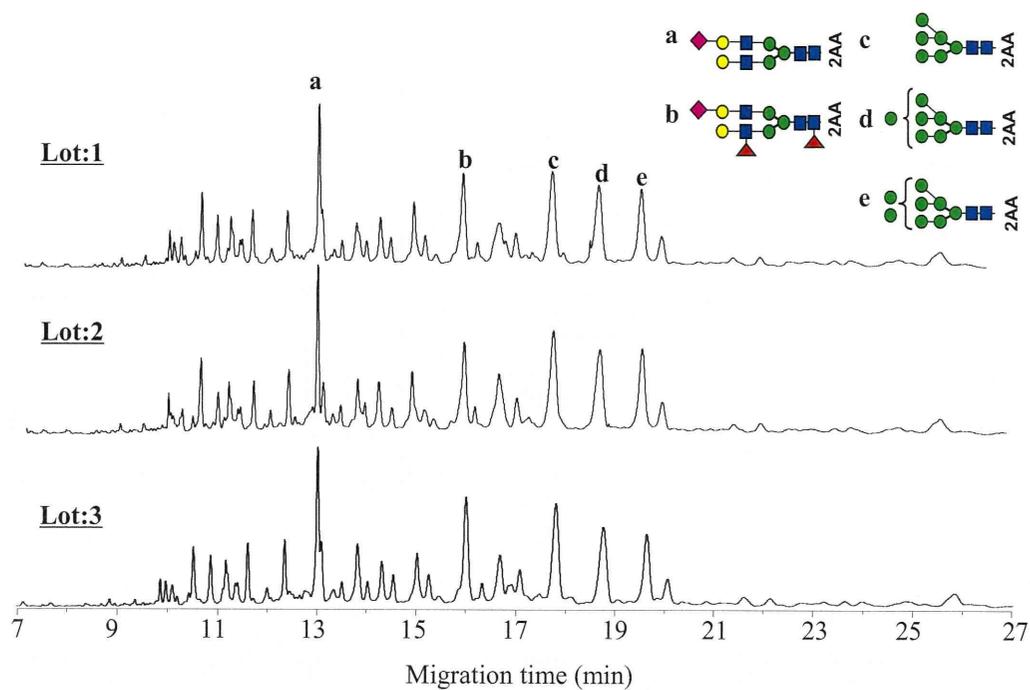


Fig.5 CE analysis of N-linked glycans derived from MKN45 cells. Analytical conditions; capillary, DB-1 capillary (40 cm x 100  $\mu$ m.i.d). Buffer, 100 mM Tris-borate buffer (pH 8.3) containing 10 %PEG70000. Applied voltage, 25 kV. Injection, pressure method (1.0 psi, 5 sec). Temperature, 25  $^{\circ}$ C. Detection, He-Cd laser induced fluorescent detection (Ex: 325 nm, Em: 405 nm).

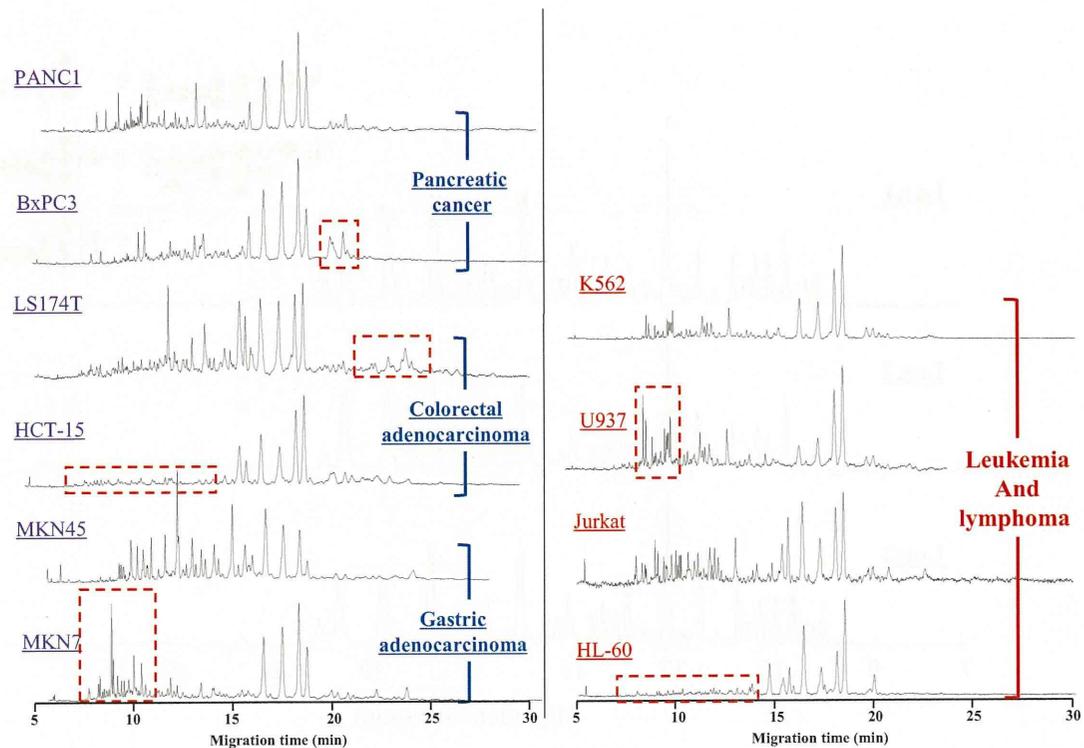


Fig.6 CE analysis of N-linked glycans derived from various cancer cells. Analytical conditions; capillary, DB-1 capillary (40 cm x 100  $\mu$ m.i.d). Buffer, 100 mM Tris-borate buffer (pH 8.3) containing 10 %PEG70000. Applied voltage, 25 kV. Injection, pressure method (1.0 psi, 5 sec). Temperature, 25  $^{\circ}$ C. Detection, He-Cd laser induced fluorescent detection (Ex: 325 nm, Em: 405 nm).

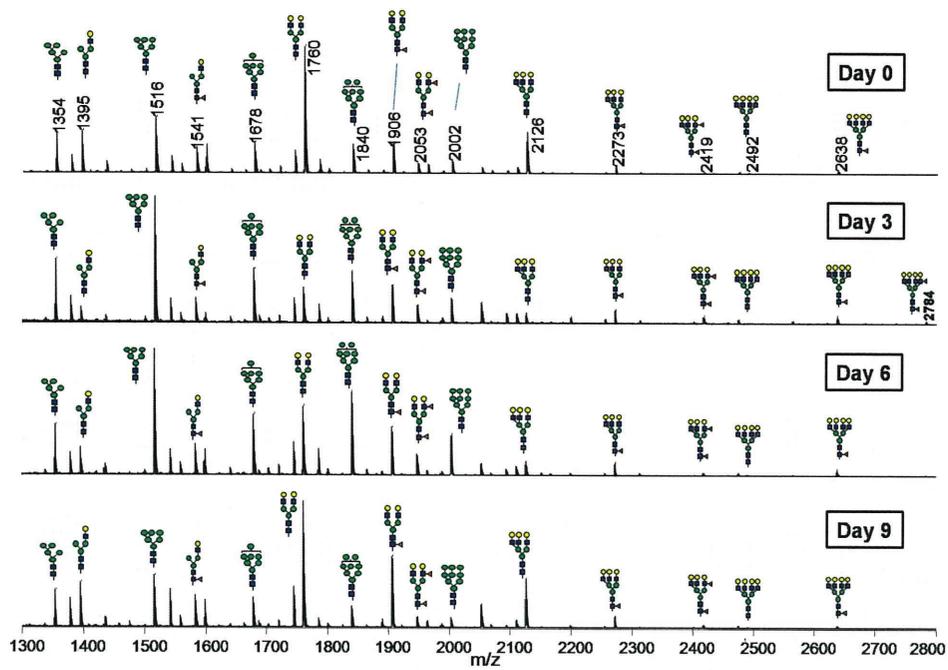


Fig. 7. MALDI-TOF MS analysis of N-glycans in P19 cell after differentiation with retinoic acid. Analytical conditions: apparatus, AXIMA resonance; polarity, negative ion mode; matrix, 2, 5-dihydroxybenzoic acid.



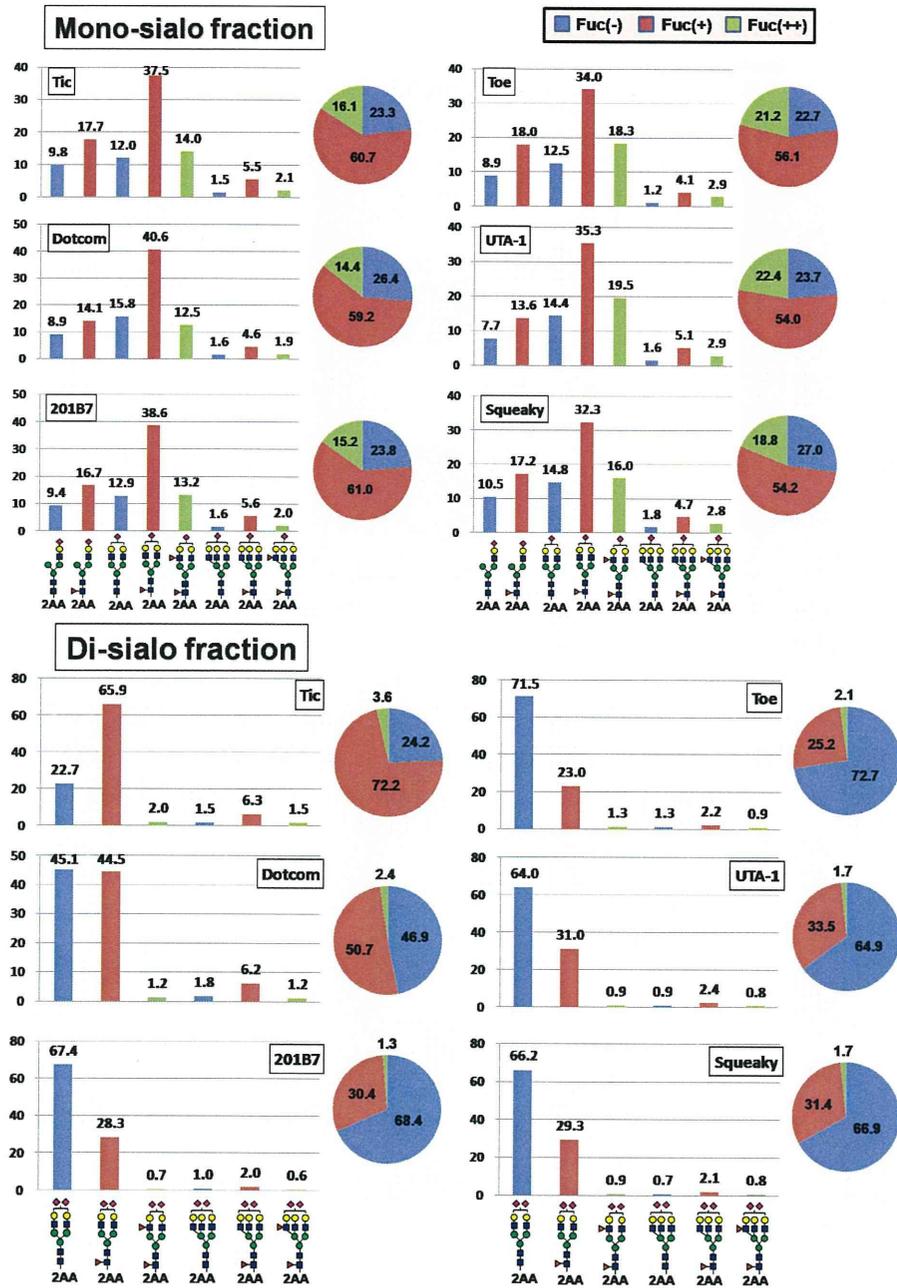


Fig. 9. Relative amounts of N-glycans observed in Mono-sialo and Di-sialo fractions in six iPS cells.

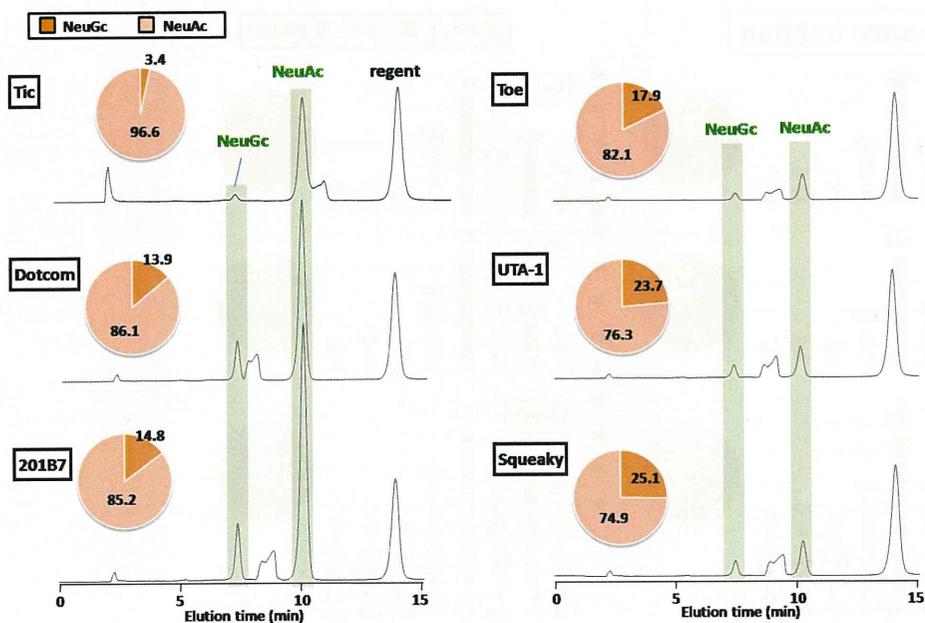


Fig. 10. Analysis of Sialic Acids in six iPS cells. Analytical condition: colum, COSMOSIL 5C18-II (4.6 x 250 mm); flow rate, 0.9 mL/min; eluent, 2% Acetonitrile/14% Methanol in water; elution conditions: isocratic elution

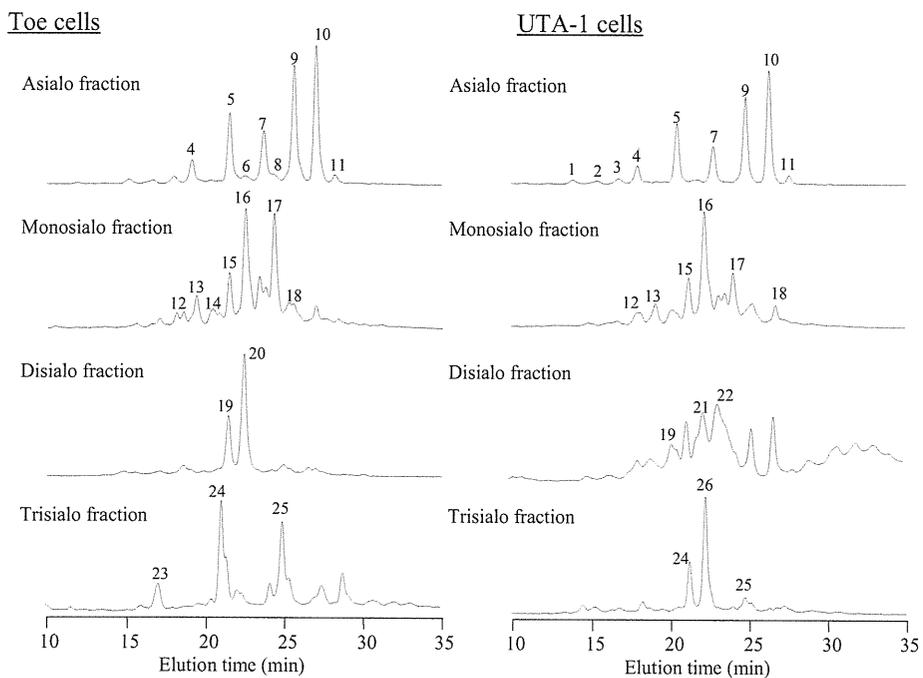


Fig. 11. NP-HPLC analysis of N-glycans fractionated by serotonin affinity chromatography. Analytical conditions: column, TSK-GEL Amide-80 (4.6 x 250 mm). flow rate, 0.8 mL/min. eluent, solvent A, 0.1% CH<sub>3</sub>COOH in MeCN. solvent B, 0.2% CH<sub>3</sub>COOH/0.2% triethylamine in water. gradient conditions: a linear gradient (15-50 % solvent B) from 5 to 85 min.

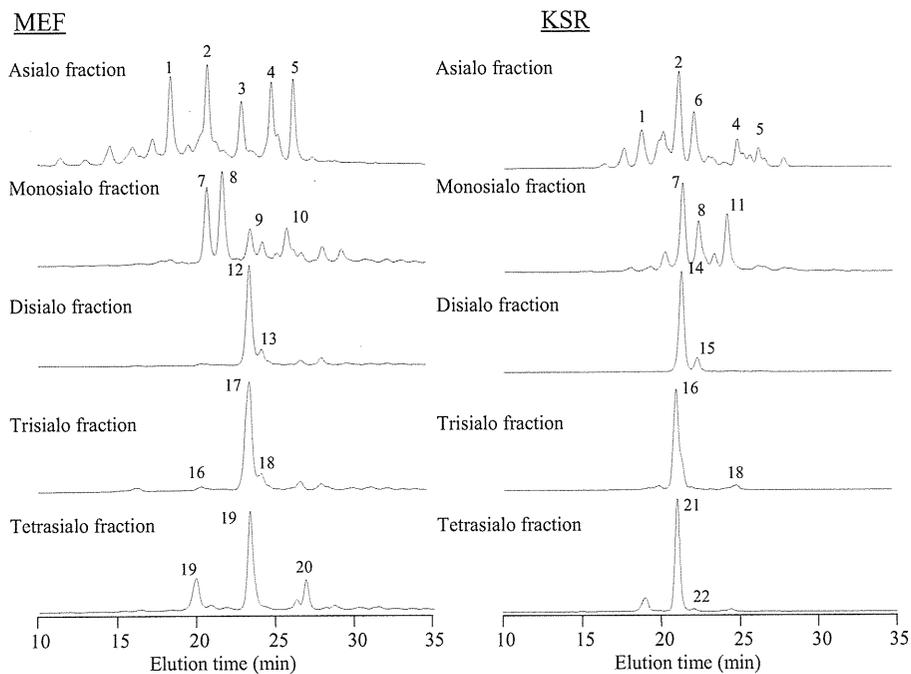


Fig. 12. NP-HPLC analysis of N-glycans fractionated by serotonin affinity chromatography. Analytical conditions: column, TSK-GEL Amide-80 (4.6 x 250 mm). flow rate, 0.8 mL/min. eluent, solvent A, 0.1% CH<sub>3</sub>COOH in MeCN. solvent B, 0.2% CH<sub>3</sub>COOH/0.2% triethylamine in water. gradient conditions: a linear gradient (15-50 % solvent B) from 5 to 85 min.

Table 1 Mucin-type O-glycans observed in HCT116 cell.

M1		M4	
504	Gal-GalNAc-2AA	1815	<b>NeuAc</b> $\alpha$ 2-3Gal $\beta$ 1-3 { <b>NeuAc</b> $\alpha$ 2-6(Gal-GlcNAc) $_2\beta$ 1-6} GalNAc-2AA
546	GlcNAc-GalNAc-2AA	1969	Gal $\beta$ 1-3 {(Gal-GlcNAc) $_3\beta$ 1-6} GalNAc-2AA + <b>NeuAc</b> + <b>SO<sub>3</sub></b>
625	GlcNAc-GalNAc-2AA + <b>SO<sub>3</sub></b>	2180	<b>NeuAc</b> $\alpha$ 2-3Gal $\beta$ 1-3 { <b>NeuAc</b> $\alpha$ 2-6(Gal-GlcNAc) $_3\beta$ 1-6} GalNAc-2AA
706	Gal $\beta$ 1-3(GlcNAc $\beta$ 1-6)GalNAc-2AA	2335	Gal $\beta$ 1-3 {(Gal-GlcNAc) $_4\beta$ 1-6} GalNAc-2AA + <b>NeuAc</b> + <b>SO<sub>3</sub></b>
786	Gal $\beta$ 1-3(GlcNAc $\beta$ 1-6)GalNAc-2AA + <b>SO<sub>3</sub></b>	2546	<b>NeuAc</b> $\alpha$ 2-3Gal $\beta$ 1-3 { <b>NeuAc</b> $\alpha$ 2-6(Gal-GlcNAc) $_4\beta$ 1-6} GalNAc-2AA
868	Gal $\beta$ 1-3 (Gal-GlcNAc $\beta$ 1-6)GalNAc-2AA	M5	
949	Gal $\beta$ 1-3 (Gal-GlcNAc $\beta$ 1-6)GalNAc-2AA + <b>SO<sub>3</sub></b>	1450	<b>NeuAc</b> $\alpha$ 2-3Gal $\beta$ 1-3 ( <b>NeuAc</b> $\alpha$ 2-6Gal-GlcNAc $\beta$ 1-6)GalNAc-2AA
1234	Gal $\beta$ 1-3 {(Gal-GlcNAc) $_2\beta$ 1-6} GalNAc-2AA	1815	<b>NeuAc</b> $\alpha$ 2-3Gal $\beta$ 1-3 { <b>NeuAc</b> $\alpha$ 2-6(Gal-GlcNAc) $_2\beta$ 1-6} GalNAc-2AA
M2		M6	
1158	Gal $\beta$ 1-3 (Gal-GlcNAc $\beta$ 1-6)GalNAc-2AA + <b>NeuAc</b>	1085	<b>NeuAc</b> $\alpha$ 2-3Gal $\beta$ 1-3( <b>NeuAc</b> $\alpha$ 2-6)GalNAc-2AA
1361	Gal $\beta$ 1-3 (GlcNAc-Gal-GlcNAc $\beta$ 1-6)GalNAc-2AA + <b>NeuAc</b>	1238	Gal $\beta$ 1-3 (Gal-GlcNAc $\beta$ 1-6)GalNAc-2AA + <b>NeuAc</b> + <b>SO<sub>3</sub></b>
1523	Gal $\beta$ 1-3 {(Gal-GlcNAc) $_2\beta$ 1-6} GalNAc-2AA + <b>NeuAc</b>	1440	Gal $\beta$ 1-3 (GlcNAc-Gal-GlcNAc $\beta$ 1-6)GalNAc-2AA + <b>NeuAc</b> + <b>SO<sub>3</sub></b>
1888	Gal $\beta$ 1-3 {(Gal-GlcNAc) $_3\beta$ 1-6} GalNAc-2AA + <b>NeuAc</b>	1450	<b>NeuAc</b> $\alpha$ 2-3Gal $\beta$ 1-3 ( <b>NeuAc</b> $\alpha$ 2-6Gal-GlcNAc $\beta$ 1-6)GalNAc-2AA
2253	Gal $\beta$ 1-3 {(Gal-GlcNAc) $_4\beta$ 1-6} GalNAc-2AA + <b>NeuAc</b>	1604	Gal $\beta$ 1-3 {(Gal-GlcNAc) $_2\beta$ 1-6} GalNAc-2AA + <b>NeuAc</b> + <b>SO<sub>3</sub></b>
2618	Gal $\beta$ 1-3 {(Gal-GlcNAc) $_5\beta$ 1-6} GalNAc-2AA + <b>NeuAc</b>	1684	Gal $\beta$ 1-3 {(Gal-GlcNAc) $_2\beta$ 1-6} GalNAc-2AA + <b>NeuAc</b> + <b>2SO<sub>3</sub></b>
M3		1764	Gal $\beta$ 1-3 {(Gal-GlcNAc) $_2\beta$ 1-6} GalNAc-2AA + <b>NeuAc</b> + <b>3SO<sub>3</sub></b>
633	<b>NeuAc</b> $\alpha$ 2-6GalNAc-2AA	2260	<b>NeuAc</b> $\alpha$ 2-3Gal $\beta$ 1-3 { <b>NeuAc</b> $\alpha$ 2-6(Gal-GlcNAc) $_3\beta$ 1-6} GalNAc-2AA + <b>SO<sub>3</sub></b>
795	<b>NeuAc</b> $\alpha$ 2-3Gal $\beta$ 1-3GalNAc-2AA	2626	<b>NeuAc</b> $\alpha$ 2-3Gal $\beta$ 1-3 { <b>NeuAc</b> $\alpha$ 2-6(Gal-GlcNAc) $_4\beta$ 1-6} GalNAc-2AA + <b>SO<sub>3</sub></b>
998	<b>NeuAc</b> $\alpha$ 2-3Gal $\beta$ 1-3(GlcNAc $\beta$ 1-6)GalNAc-2AA	2106	<b>NeuAc</b> $\alpha$ 2-3Gal $\beta$ 1-3 { <b>NeuAc</b> $\alpha$ 2-6(Gal-GlcNAc) $_2\beta$ 1-6} GalNAc-2AA + <b>NeuAc</b>
1160	Gal $\beta$ 1-3 (Gal-GlcNAc $\beta$ 1-6)GalNAc-2AA + <b>NeuAc</b>	2471	<b>NeuAc</b> $\alpha$ 2-3Gal $\beta$ 1-3 { <b>NeuAc</b> $\alpha$ 2-6(Gal-GlcNAc) $_3\beta$ 1-6} GalNAc-2AA + <b>NeuAc</b>