

## 論文内容の要旨

論文題目 細胞が産生する O-結合型糖鎖のピレン標識法による微量解析

氏名 菅原 大介

### 【背景・目的】

細胞表面に発現する多種類の糖鎖は細胞種に特異的な発現パターンを持ち、細胞の分化、増殖や活性化、細胞の状態によっても大きく変化する。多種類の糖鎖より提示されている情報をそれぞれの糖鎖に特異的に認識分子であるレクチンが認識することにより、癌転移、免疫細胞の生体内交通、受精など高次の生命現象が制御される。

細胞が産生する糖鎖の生合成制御に様々な分子が関与するが、糖転移酵素の基質特異性、発現量、ゴルジ装置における局在により、細胞が産生する複数の糖鎖の構造が大きく影響される。細胞が産生する糖鎖の差異や変化を理解するため、糖転移酵素 mRNA の発現量変化が測定され報告されてきた。糖鎖生合成は糖転移酵素の遺伝子発現量以外の要因からも大きく影響を受けるため、糖転移酵素の mRNA 発現量変化からある細胞において糖鎖の比率で生合成されていると予想することは不可能である。そのため、細胞が産生する複数の多様な糖鎖の構造を一つづつ化学的に解析することが非常に重要である。従って、細胞が産生する N-結合型糖鎖と比較して O-結合型糖鎖の微量解析法は十分に確立されていないため、糖鎖生物学研究を進めるうえで大きな問題であった。

本研究では糖転移酵素の遺伝子発現に伴って細胞が産生する糖鎖の構造が変化する変化の全体像を明らかにすることを目的として、ピレン標識法（図 1）は N-結合型糖鎖解析に頻用される 2-ピリジルアミン標識法と比較して 30 倍の検出感度を持つ。標識糖鎖を用いた ELISA 法を糖鎖解析に応用できるように見出している。多様な構造を有する O-結合型糖鎖の解析に適する考え、本研究では細胞が産生する O-結合型糖鎖のヒドラジン分解による遊離法及び

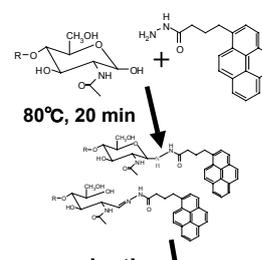


図 1. 糖鎖還元末端への  
1-pyrenebutanoic  
hydrazide 導入反応

レン標識法による O-結合型糖鎖の解析法の開発を行なう。次に開発方法により腫瘍関連糖鎖抗原の生合成に関与する糖転移酵素遺伝子を導入したヒト大腸癌細胞株を用い、糖転移酵素遺伝子発現に伴い細胞が産生する O-結合型糖鎖の構造変化を解析した。培養細胞に糖転移酵素遺伝子を導入した際、細胞出現する糖鎖構造を明らかにする。糖転移酵素の基質特異性や複雑な糖鎖生合成経路統合状態を解明するうえで必須となるためである。

## 【方法・結果】

### ピレン標識法の改善

糖鎖還元末端-ピレン誘導体間結合を還元しヒドラジド結合とする。還元末端糖鎖を開環状態固定しピレン標識糖鎖を単一の構造とする条件を決定した。N-アセチルラクトサミン (Galβ1,4GlcNAc) 1 nmol、1-pyrenebutanoic acid hydrazide (PBH Molecular probes) 500 nmol を酢酸-メタノール (1/8 = v/v) に溶解し、80 °C に 20 分間反応を行ない、糖鎖還元末端ヒドラゾン結合を介し PBH を導入した。PBH 導入反応後、還元試薬として NaBH<sub>4</sub> を加え、ヒドラゾン結合を還元しヒドラジド結合とする反応を行ない、反応条件を検討した。結果、1M NaBH<sub>4</sub> を加え、pH 8.5 にて 40 °C、20 分間反応させるとよりピレン標識糖鎖の 95% 以上がヒドラジド結合へ還元された。これを HPLC 及び MALDI-TOF MS による質量分析結果から確認した。6-シアリルラクトサミンを用いて検討を行なう。シアリル酸の脱離は検出されなかった。そこで以下の実験では上記の条件にてピレン標識を糖鎖還元末端へ導入することとした。

### ヒト大腸癌細胞株における糖転移酵素遺伝子発現に伴う O-結合型糖鎖の変化

#### 1. α2,6 シアル酸転移酵素 I (ST6GalNAc-I) 遺伝子導入細胞

ST6GalNAc-I はセリンまたはスレオニンに結合した N-アセチルガラクトサミン残基に α2,6 結合によりシアル酸を転移しシアリル Tn (sTn) 抗原を生合成する。本酵素を発現しないヒト大腸癌細胞株 HCT-15 細胞に ST6GalNAc-I 遺伝子を導入し、本酵素発現に伴い出現する O-結合型糖鎖を解析した。本酵素遺伝子導入細胞 (以下 HCT-ST6 細胞) 及びモックトランスフェクタント細胞、各 1x10<sup>7</sup> 個をペレットとし、脱脂処理及びプロナーゼ処理後、遠心式限外ろ過膜 (セントリコン YM-3、ミリポア、分画分子量 3000) を用い徹底的に脱塩処理を行なった。これらの処理により得られた O-結合型糖鎖を豊富に含む糖ペプチドの 10% を用いて 60 °C、5 時間、ヒドラジン分解を行ない O-結合型糖鎖を遊離した。上述の方法によりピレン誘導体を糖鎖還元末端へ導入し、アミノカラム

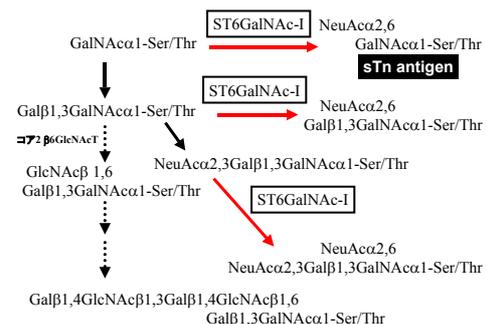


図 2. ST6GalNAc-I 遺伝子導入による O-結合型糖鎖生合成の変化

HPLC (COSMOSIL 5NH<sub>2</sub>-MS、4.6x150 mm、ナカライテスク) により糖鎖を分離した。ウシフェ

特異的シアリダーゼ処理前後の溶出位置の変化から付加されたシアル酸の結合様式を推定した。解析の結果、HCT-ST6 細胞ではモック細胞では産生が確認されなかった NeuAc $\alpha$ 2,6GalNAc、Gal $\beta$ 1,3(NeuAc $\alpha$ 2,6)GalNAc、NeuAc $\alpha$ 2,3Gal $\beta$ 1,3(NeuAc $\alpha$ 2,6)GalNAc の出現が確認された。また、HCT-ST6 細胞においては Gal $\beta$ 1,4GlcNAc $\beta$ 1,3Gal $\beta$ 1,4GlcNAc $\beta$ 1,6(Gal $\beta$ 1,3)GalNAc の割合がモック細胞の約3分の2へ低下したことが明らかになり、コア2糖鎖から伸長したO結合型糖鎖の産生が阻害されたと考えられた。これは Gal $\beta$ 1,3GalNAc $\alpha$ 1-Ser/Thr を基質とするコア 2  $\beta$ 1,6N-アセチルグルコサミン転移酵素と本酵素が基質を競合した結果、コア 2 糖鎖の生合成が抑制され、コア 2 糖鎖からのラクトサミン糖鎖の伸長が阻害された結果と考えられた (図 2)。

## 2. $\beta$ 1,3 ガラクトース転移酵素 5 ( $\beta$ 3Gal-T5) 遺伝子導入細胞

$\beta$ 3Gal-T5 は N-アセチルグルコサミン残基に  $\beta$ 1,3 結合によりガラクトースを転移する糖転移酵素である。大腸癌、膵臓癌の進展に伴い患者血清中において発現が上昇する腫瘍マーカー CA19-9 抗原 (シアリルルイス a 抗原 :

NeuAc $\alpha$ 2,3Gal $\beta$ 1,3(Fuc $\beta$ 1,4)GlcNAc $\beta$ -R) をはじめとするタイプ 1 骨格糖鎖 (Gal $\beta$ 1,3GlcNAc $\beta$ -R) 生合成に重要な酵素である。本酵素遺伝子を発現していないヒト大腸癌細胞株 HCT-15 細胞に  $\beta$ 3Gal-T5 遺伝子を

導入し、それに伴う糖鎖の変化を解析した。本酵素遺伝子導入細胞 (以下 HCT-3GT5 細胞) 及びモックトランスフェクタント細胞が産生する O-結合型糖鎖を上述の

*ST6GalNAc-I* 遺伝子導入細胞における解析と同様の方法にて比較した。アミノカラム HPLC による比較では、本酵素導入より出現したピークが複数検出されこれらはいずれもシアル酸結合糖鎖であると明らかになった (図 3)。シアリダーゼ処理による糖鎖基質特異性の広いコシダーゼ (ウシ腎臓由来) 処理を行い、結果得られた糖鎖を  $\beta$ 1,4 結合特異的な  $\beta$ -ガラクトシダーゼ (肺炎双球菌由来) 及び基質特異的に低い  $\beta$ -ガラクトシダーゼ (タチナタマメ由来) 処理を行い、処理前後の溶出位置変化から糖鎖構造を推定した。その結果、コア 1 糖鎖を除く HCT-3GT5 細胞が産生する O-結合型糖鎖の非還元末端はタイプ 1 骨格糖鎖をもつことが明らかになった。ガラクトース転移酵素である本酵素の酵素基質特異性からは予想しがたいシアル酸結合糖鎖の産生にも影響したことが明らかになった。

### 【結語】

糖転移酵素発現に伴う O-結合型糖鎖の細胞全体による変化を明らかにするためヒドラジン分解による O-結合型糖鎖の遊離法及びピレン標識法による解析法を確立し脱脂した細胞をプロナーゼ消化後遠心式限外ろ過膜により徹底的脱塩処理を行い、細胞からヒドラジン分解により O-結合型糖鎖を遊離し、確立した方法に従い  $\beta$ Gal-T5 及び *ST6GalNAc-I* 遺伝子発現に伴う O-結合型糖鎖変化を解析し糖転移酵素発現の影響範囲の糖鎖へ及ぼすことを示し糖鎖生合成に関与する分子糖転移酵素を含め 160 以上が発見クローニングされ様々な生命現象におけるこれらの分子の遺伝子発現変化が明らか

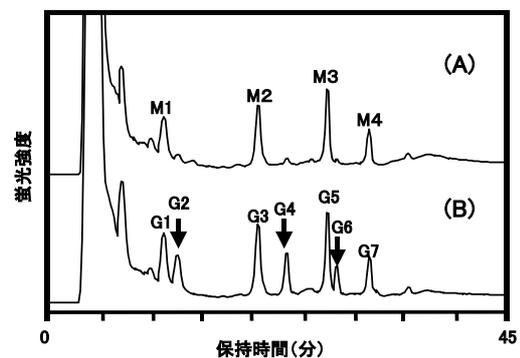


図 3.  $\beta$ 3Gal-T5 遺伝子導入に伴う O-結合型糖鎖の変化 (A) HCT-mock 細胞 (B) HCT-3GT5 細胞

れている。これらの分子により生合成され状況に応じて変化する糖鎖生命現象における役割を演じているほとんど明らか  
な糖鎖生物学研究糖転移酵素をよめる糖鎖生合成に関する個々の分子の研究は進められ  
てきた。反面これらの分子の協調的な作用により生合成され、実際に生命現象における機能を担う糖鎖の解析は無  
視され、レクチンとの相互作用により生命現象を制御する糖鎖あり細胞による糖鎖を産生している明らか  
な糖鎖機能を理解するために必須である。本研究で糖鎖解析が特に困難なO-結合型糖鎖を細胞  
から遊離し、ピレン標識法により高感度で解析する方法を確立し、今後本研究をもとに糖鎖の構造と機能の相  
関が明らかにされることが期待される。

(参考文献) D. Sugahara *et.al.* *Analytical Sciences*, 19, 167–169, 2003