

# 細胞膜タンパク質の糖鎖

## CHO 細胞と Lec1 変異細胞の糖鎖プロファイリング

細胞はその種類や状態によって、細胞表面に異なった糖鎖構造を持っています。このことから、糖鎖は細胞の顔とも呼ばれています。現在まで、この糖鎖を利用して指紋認証的に細胞を区別する簡易的で高感度な方法がありませんでした。ここでは、レクチンマイクロアレイを用いた CHO 細胞とその GlcNAc 転移酵素 I ノックアウトである Lec1 変異細胞の糖鎖プロファイリングについて述べます。細胞膜タンパク質を抽出して蛍光ラベルし、レクチンマイクロアレイを用いてそのシグナルの違いを明瞭に検出することができました。

### ◆ GlcNAc 転移酵素 I

Fig.1 に示すように GlcNAc 転移酵素 I (GlcNAc-transferase I) は、複合型糖鎖の形成においてコア構造の 1-3 アームへの GlcNAc 残基の結合に働きます。したがって、GlcNAc-T I が欠損している Lec1 変異細胞では複合型糖鎖の合成が進まなくなり、ハイマンノース型糖鎖の発現率が上がるといった N 結合型糖鎖の変化が予測されます。

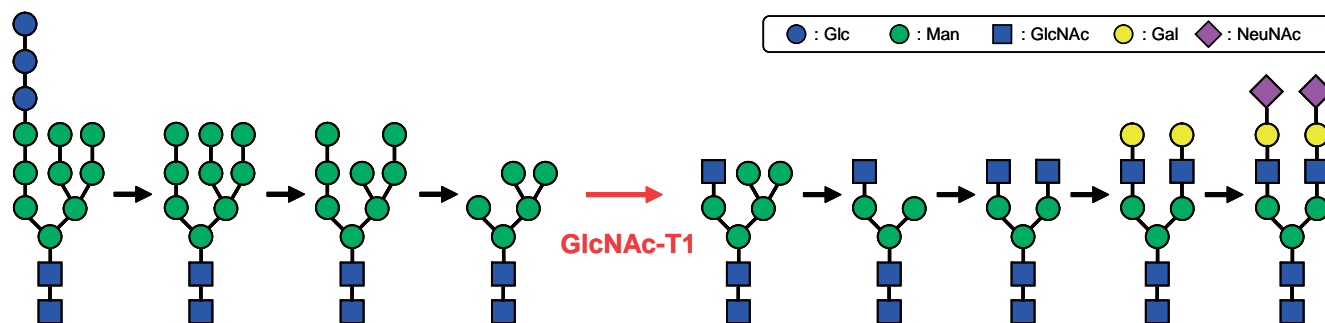


Fig.1 ハイマンノース型糖鎖から複合型糖鎖への形成に働く GlcNAc-T I

### ◆ 特徴的なレクチンのシグナル差異

レクチンマイクロアレイ解析によって、N 結合型糖鎖認識レクチンのシグナルに差異が検出されました。分岐した複合型 N 結合型糖鎖認識レクチン (PHA(L), PHA(E), ACG)、 $\alpha$ 2,3-Sia 認識レクチン (MAL I)、ガラクトース認識レクチン (RCA120) のシグナルは、Lec1 変異細胞で減少がみられます (Fig.2(A) 参照)。一方、ハイマンノース型の N 結合型糖鎖認識レクチン (GNA, HHL, PWM, Calsepa, PSA, LCA) のシグナルは、Lec1 変異細胞で増加がみられます (Fig.2(B) 参照)。これらのシグナル差異は、Lec1 が糖転移酵素 GlcNAc-T1 の欠損であることから考えて極めて合理的な結果です。

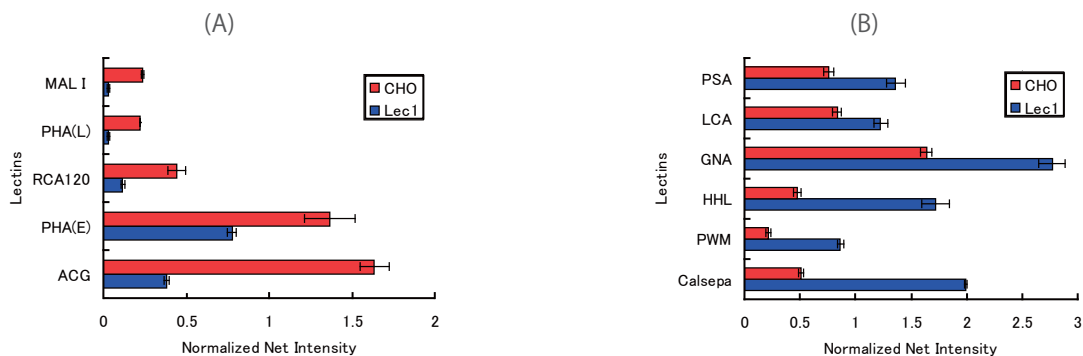


Fig.2 CHO 細胞と Lec1 変異細胞の比較 (A) CHO で高いレクチンシグナル (B) Lec1 で高いレクチンシグナル

## ◆ 濃度依存性測定と糖鎖プロファイリングパターン

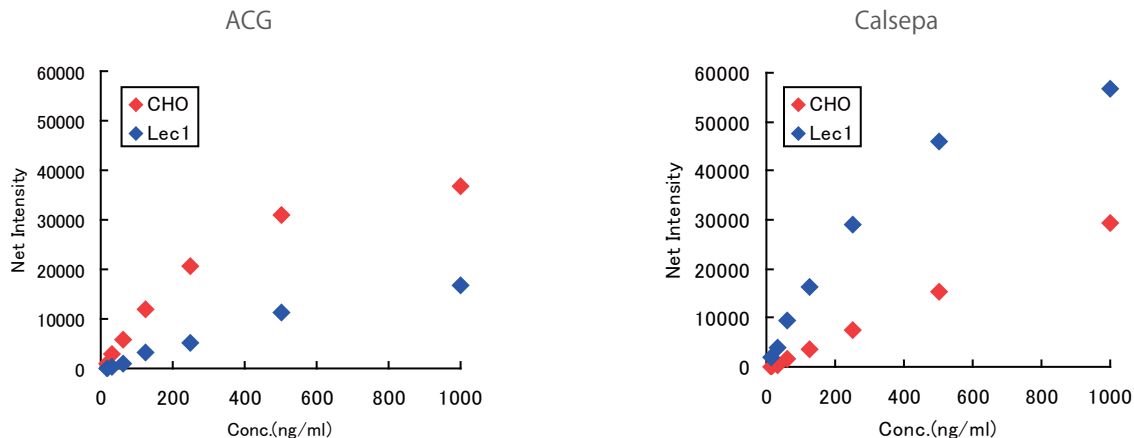


Fig.3 ACG と Calsepa のサンプル濃度依存性 (CHO vs. Lec1)

レクチンマイクロアレイのシグナルは、サンプルの濃度に応じてそのシグナルが変化します。したがって、定量的な比較が可能です。Fig.3 に CHO 細胞と Lec1 変異細胞の膜画分を濃度を変えて測定した、分岐した複合型 N 結合型糖鎖認識レクチン (ACG) および Man 認識レクチン (Calsepa) のシグナルにおける濃度曲線グラフを示します。レクチンシグナルが濃度的にサチュレーションしていない領域であれば、サンプル濃度が異なっても比較サンプル間の差異は同じでありプロファイリングパターンは一定となることも、本システムの魅力の一つです。

## - 測定方法 -

## 1. 細胞サンプルの回収と分画

- 1-1.  $1.5 \times 10^6$  個の細胞を PBS で洗浄して、 $-80^\circ\text{C}$  に保存します。
- 1-2. 1-1 の細胞を Kit<sup>1)</sup> を用いて、細胞質画分・細胞膜画分に分画します。

## 2. 蛍光標識

- 2-1. Micro BCA Protein Assay Reagent Kit<sup>2)</sup> を用いてタンパク定量します (反応時間 2h)。
- 2-2. PBS<sup>3)</sup> で、サンプル  $50 \mu\text{g/ml}$ ,  $20 \mu\text{l}$  を調製し、これを Cy3 Mono-Reactive dye  $100 \mu\text{g}$  labeling<sup>4)</sup> に混合します。
- 2-3. 2-2 を室温、暗所で 1h 反応させます。
- 2-4. ゲルろ過カラム<sup>5)</sup> に TBS<sup>6)</sup>  $300 \mu\text{l}$  をアプライし、 $1,500 \times \text{g}$ ,  $1 \text{min}$ ,  $4^\circ\text{C}$  遠心します (カラム洗浄)。
- 2-5. 2-4 を 2 回繰り返します。
- 2-6. 2-5 のゲルろ過カラムに 2-3 全量と TBS  $25 \mu\text{l}$  をアプライして、 $1,500 \times \text{g}$ ,  $2 \text{min}$ ,  $4^\circ\text{C}$  で遠心してゲルろ過を行い、未反応の Cy3 を除きます。

## 3. レクチンマイクロアレイの測定

- 3-1. サンプルを Probing Solution<sup>7)</sup> でアプライする濃度に希釈します。
- 3-2. LecChip<sup>™</sup><sup>8)</sup> を Probing Solution で 3 回洗浄後、サンプルをアプライします ( $100 \mu\text{l/well}$ )。
- 3-3.  $20^\circ\text{C}$  で LecChip を O.N. 反応させます。
- 3-4. サンプルをアプライしたままの状態 で LecChip を GlycoStation™ Reader 1200<sup>9)</sup> で測定します。
- 3-5. Array-Pro Analyzer<sup>10)</sup>、GlycoStation™ Tools<sup>11)</sup> で解析します。

## Note

- 1) ProteoExtract® Subcellular Proteome Extraction Kit (Calbiochem, #539790)
- 2) Micro BCA Protein Assay Reagent Kit (PIERCE, #23235)
- 3) PBS(-) pH7.3
- 4) Cy3 Mono-Reactive dye pack (GE, #PA23011) を  $100 \mu\text{g}$  labeling ずつ分けたものを用いる。
- 5) Zeba Desalt Spin Columns,  $0.5 \text{ml}$  (Thermo, #89883)
- 6) TBS pH7.5
- 7) Probing Solution (Glycotecnica)
- 8) LecChip™ (Glycotecnica)
- 9) GlycoStation™ Reader 1200 (Glycotecnica)
- 10) Array-Pro Analyzer ver.4.5 (MEDIA CYBERNETICS)
- 11) GlycoStation™ Tools (Glycotecnica)